

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

**ELECTROLIBERACIÓN DE CURCUMINA CARGADA EN UN  
POLÍMERO CONDUCTOR A TRAVÉS DE UN MEDIO  
BIODEGRADABLE**



**Memoria**

<b>Autor:</b>	Roberto Bautista Martínez
<b>Director:</b>	Carlos Enrique Alemán Llanso
<b>Co-Director:</b>	Nuria Borrás Cristofol
<b>Convocatoria:</b>	Enero 2018



## Resum

Aquest treball estudia un sistema químic complex format per un hidrogel carregat amb nanopartícules de poli(3,4-etiliendioxitiófé)(PEDOT), i que alhora estan carregades amb curcumina, un fàrmac de gran interès per les seves propietats terapèutiques. El projecte està dividit en tres parts. A la primera etapa s'han sintetitzat i caracteritzat nanopartícules de PEDOT i nanopartícules de PEDOT carregades amb curcumina. A la segona etapa s'ha implementat el hidrogel d'àcid poli( $\gamma$ -glutàmic) (PGA). Per lo tant s'han sintetitzat hidrogels carregant *in situ* les nanopartícules obtingudes a la primera etapa, caracteritzant-se tant la seva morfologia com algunes de les seves propietats. A més, s'han preparat hidrogels carregats directament amb curcumina, els quals s'han emprat com sistemes de control. Finalment, a la tercera etapa s'ha realitzat una polimerització electroquímica *in situ* dels hidrogels prèviament carregats (segona etapa) incorporant una major quantitat de polímer conductor, amb la finalitat d'incrementar la electrosensibilitat dels hidrogels carregats. Addicionalment, s'ha examinat l'alliberament i s'han estudiat els hidrogels preparats a la segona etapa, afegint un pas d'electropolimerització per poder incrementar la quantitat de polímer conductor en el interior del hidrogel i s'ha examinat l'alliberació controlada de la curcumina mitjançant una sèrie d'electro-estímul.

L'objectiu final del treball es determinar la viabilitat d'emprar un hidrogel amb nanopartícules de PEDOT carregades amb curcumina capaç de regular l'alliberació del fàrmac a partir d'electro-estímul. Amb aquesta finalitat s'han emprat diferents tècniques de caracterització i anàlisi, com per exemple microscòpia electrònica per escombrat (SEM), voltametria cíclica, espectroscòpies FTIR, Raman i UV-vis, y espectroscòpia de impedància electroquímica.

Els resultats obtinguts de treball exploratori demostren que el sistema dissenyat és electrosensible i permet alliberar fàrmac de forma controlada a partir d'electroestimulació. El sistema desenvolupat en el treball presenta les limitacions habituals emprades en biomedicina, com ara les associades a la càrrega de les nanopartícules en el hidrogel, que és lenta i limitada. No obstant això, tot i tenir en compte la complexitat del sistema i que es tracta d'un estudi pioner, els resultats obtinguts són molt prometedors i posen de manifest la potencialitat del sistema.

## Resumen

Este trabajo trata sobre el estudio de un sistema químico complejo formado por un hidrogel cargado con nanopartículas de poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), y que a su vez están cargadas con curcumina, un fármaco de gran interés por sus propiedades terapéuticas. El proyecto se divide en tres partes. En la primera etapa se han sintetizado y caracterizado nanopartículas de PEDOT y nanopartículas de PEDOT cargadas con curcumina. En la segunda etapa se ha implementado el hidrogel de ácido poli( $\gamma$ -glutámico) (PGA). Por lo tanto, se han sintetizado hidrogeles cargando *in situ* las nanopartículas obtenidas en la primera etapa, caracterizándose tanto su morfología como de algunas de sus propiedades. Además, se han preparado hidrogeles cargados directamente con curcumina, los cuales se han empleado como sistemas de control. Finalmente, en la tercera etapa se ha realizado una polimerización electroquímica *in situ* los hidrogeles previamente cargados (segunda etapa) incorporando mayor cantidad de polímero conductor, con el fin de incrementar la electrosensibilidad de los hidrogeles cargados. Adicionalmente, se ha examinado la liberación controlada de la curcumina mediante una serie de electro-estímulos.

El objetivo global del trabajo es determinar la viabilidad de emplear un hidrogel con nanopartículas de PEDOT cargadas con curcumina como capaz de regular la liberación del fármaco a partir de electro-estímulos. Durante la ejecución del proyecto se han empleado diferentes técnicas de caracterización y análisis, como por ejemplo microscopía electrónica de barrido (SEM), voltametría cíclica, espectroscopias FTIR, Raman y UV-vis, y espectroscopía de impedancia electroquímica.

Los resultados obtenidos de trabajo exploratorio demuestran que el sistema diseñado es electrosensible y permite liberar fármaco de forma controlada a partir de electroestimulación. El sistema desarrollado en el trabajo presenta las limitaciones habituales empleadas en biomedicina, como ejemplo las asociadas a la carga de las nanopartículas en el hidrogel, que es lenta y limitada. Sin embargo, aun teniendo en cuenta la complejidad del sistema y que se trata de un estudio pionero, los resultados obtenidos son muy prometedores y ponen de manifiesto la potencialidad del sistema.

## Abstract

This project talks about the study of a complex chemical system formed by a hydrogel loaded with poly (3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticles (PEDOT), which in turn are loaded with curcumin, a drug of great interest for its therapeutic properties. The project is divided into three parts. In the first stage, PEDOT nanoparticles and PEDOT nanoparticles loaded with curcumin were synthesized and characterized. In the second stage, the poly ( $\gamma$ -glutamic acid) (PGA) hydrogel has been implemented. Therefore, hydrogels have been synthesized by loading in situ the nanoparticles obtained in the first stage, characterizing both their morphology and some of their properties. In addition, they have prepared hydrogels directly loaded with curcumin, which have been used as control systems. Finally, in the third stage, an in situ electrochemical polymerization of the previously loaded hydrogels (second stage) incorporating a larger amount of conductive polymer has been carried out in order to increase the electrosensitivity of the charged hydrogels. Additionally, the controlled release of curcumin has been examined by a series of electro-stimuli.

The overall objective of the work is to determine the feasibility of using a hydrogel with PEDOT nanoparticles loaded with curcumin as able to regulate the release of the drug from electro-stimuli. During the execution of the project, different characterization and analysis techniques have been used, such as scanning electron microscopy (SEM), cyclic voltammetry, FTIR, Raman and UV-vis spectroscopy, and electrochemical impedance spectroscopy.

The results obtained from exploratory work show that the designed system is electrosensitive and allows releasing drug in a controlled way from electrostimulation. The system developed in the work presents the usual limitations used in biomedicine, such as those associated with the loading of nanoparticles in the hydrogel, which is slow and limited. However, even taking into account the complexity of the system and that it is a pioneering study, the results obtained are very promising and show the potential of the system.

## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores, el Dr. Carlos Alemán Llanso y Nuria Borrás, por su ayuda y paciencia mostrada durante la realización de mi proyecto. Gracias a la ayuda y que me han brindado, y sus consejos para que no me estresara, ha sido posible la realización de esta memoria, que han seguido muy de cerca con sus explicaciones y correcciones.

También quisiera agradecer a Anna Puiggalí y Brenda Molina, por darme la oportunidad de realizar mi TFG en el grupo de investigación de IMEM, por su interés mostrado durante la evolución del proyecto y por la enorme ayuda día a día que me han prestado durante toda la realización de este proyecto, sin ellas estoy convencido que no lo hubiera logrado.

Por último, a todos los miembros del Grup d'Innovació en Materials i Enginyeria Molecular (IMEM) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya.

## Glosario

En el siguiente proyecto se han utilizado las siguientes abreviaturas y/o acrónimos:

APS	Persulfato de amonio
CUR	Curcumina
CV	Voltametría Cíclica
DBSA	Dodecil ácido benceno sulfónico
DLS	Dispersión dinámica de luz
EIS	Espectroscopia de impedancia electroquímica
EDOT	3,4-Etilendioxitiofeno
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
NPs	Nanopartículas
PGA	Poly $\gamma$ Glutamic Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEDOT	Poli (3,4-etilendioxitiofeno)
PET-ITO	Indium tin oxide coated PET
PPCP	PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH
PPP-OH	PGA-PEDOT-PEDOT-OH
SEM	Microscópio electrónico scanner
UV	Ultravioleta
VIS	Visible

# Índice

<b>RESUM</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1.1. Objetivos del trabajo.....	9
1.2. Alcance del trabajo.....	9
1.3. Principios básicos .....	10
1.3.1. Curva patrón.....	10
1.3.2. Espectroscopia UV-VIS.....	10
1.3.3. Espectroscopia FTIR .....	11
1.3.4. SEM .....	12
1.3.5. CV .....	13
1.3.6. EIS.....	14
1.3.7. Espectroscopia Raman.....	14
1.3.8. Hinchamiento del hidrogel .....	15
1.3.9. DLS .....	15
<b>2. ETAPA I</b>	<b>16</b>
2.1. Materiales y métodos .....	16
2.1.1. Reactivos.....	16
2.1.2. Síntesis .....	17
2.2. Caracterización .....	18
2.2.1. FTIR .....	18
2.2.2. Curva patrón.....	20
2.2.3. SEM .....	23
2.2.4. DLS .....	23
<b>3. ETAPA II</b>	<b>25</b>
3.1. Materiales y métodos .....	25
3.1.1. Reactivos.....	25



3.1.2. Síntesis .....	25
3.2. Caracterización .....	26
3.2.1. FTIR .....	28
3.2.2. RAMAN .....	28
3.2.3. EVALUACIÓN DEL HINCHAMIENTO DEL HIDROGEL.....	30
3.2.4. UV-VIS .....	30
3.2.5. SEM .....	31
3.2.6. CV .....	33
3.2.7. EIS.....	34
<b>4. ETAPA III .....</b>	<b>35</b>
4.1. Síntesis .....	35
4.2. Caracterización .....	36
4.2.1. FT-IR .....	36
4.2.2. CV .....	37
4.2.3. EIS.....	38
4.2.4. LIBERACIÓN DE CURCUMINA .....	39
<b>5. ANÁLISIS DE IMPACTO AMBIENTAL .....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>ANÁLISIS ECONÓMICO .....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>50</b>



# 1. Introducción

## 1.1. Objetivos del trabajo

Este proyecto tiene como objetivo general estudiar las propiedades físicas y electroquímicas de las nanopartículas de PEDOT cargadas con curcumina, y también cuando estas se encuentran inmersas en un medio biodegradable, en nuestro caso un hidrogel. Otro de los fines de este proyecto es el estudio de la electro-estimulación de los hidrogeles para liberar de forma controlada la curcumina.

Para alcanzar estos objetivos generales, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar químicamente y caracterizar nanopartículas de PEDOT con y sin curcumina.
- Caracterizar la morfología y diámetro efectivo de las nanopartículas sintetizadas mediante microscopía electrónica de barrido dispersión dinámica de luz.
- Encapsular las nanopartículas sintetizadas en hidrogeles biodegradables obtenidos a partir de PGA.
- Caracterizar los hidrogeles preparados en el objetivo anterior mediante diferentes técnicas como la voltametría cíclica o la impedancia electroquímica.
- Incrementar la electroactividad de los hidrogeles cargados con nanopartículas mediante la incorporación de más polímero conductor a partir de una electropolimerización *in situ*.
- Estudiar la liberación de curcumina y evaluar si los diferentes sistemas preparados son adecuados para liberar fármaco de forma controlada.

## 1.2. Alcance del trabajo

La eficiencia de la electropolimerización *in situ* se mejorará incrementando el tamaño de los poros del hidrogel. Es decir, reduciendo la concentración de cistamina empleada para generar las reticulaciones durante la síntesis del hidrogel. En este sentido, un incremento del tamaño de los poros es de esperar que facilite la difusión de los monómeros y en consecuencia incremente la eficiencia de la polimerización *in situ*. No obstante, la optimización del sistema está fuera del alcance de este trabajo, el cual tenía como objetivo principal el evaluar las posibilidades del sistema.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de posibilidades, las NPs de los polímeros conductores electroactivos (ECP) sin duda jugarán un papel decisivo en todas las disciplinas de ciencias que requieren la entrega programada de compuestos.

## 1.3. Principios básicos

### 1.3.1. Curva patrón

La realización de una curva patrón nos permitirá conocer la concentración de curcumina presente en una muestra. La realización de esta curva resulta imprescindible para determinar la eficiencia de encapsulación de la curcumina en las nanopartículas de PEDOT.

La curva patrón se ha realizado a partir de diluciones de curcumina de concentración conocida en etanol. El análisis de la absorción de la muestra ha permitido relacionar esta señal con la concentración de fármaco.

Para realizar la curva de absorción, se ha precisado de un lector de placas EZ Read 400 Microplate Reader Elisa (Figura 1), el cual mide la absorción de cada muestra.



Fig. 1 Lector de placas EZ Read 400 Microplate Elisa Reader

### 1.3.2. Espectroscopia UV-VIS

Mediante esta técnica se determina la absorción de energía a una longitud de onda ( $\lambda$ ) que se encuentra dentro del rango de luz ultravioleta (190 a 350 nm) y visible del espectro electromagnético (350 a 780 nm). Como consecuencia de la absorción selectiva de radiación, se obtiene un espectro que proporciona información fundamental relacionada con las propiedades, estructura y composición química del material.

El espectrómetro *UV-Vis SHIMADZU UV-3600* de doble haz (Figura 2) ha sido el equipo utilizado para la obtención de los espectros UV-VIS. Al ser un equipo de doble haz, se ha operado con dos cubetas.

Una de ellas se ha usado como referencia, y en la otra se han realizado las medidas de la muestra sustrayendo el valor de la referencia.



Fig. 2 Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz (UV-3600, Shimadzu)

### 1.3.3. Espectroscopia FTIR

Las siglas FTIR corresponden a “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*”. La espectroscopia infrarroja es una técnica analítica que se utiliza para identificar enlaces químicos polares en compuestos orgánicos.

Para medir el espectro se usa una matriz de fotodiodos o dispositivo de carga acoplada, de forma que cada longitud de onda se dirige a un elemento detector. En la región infrarroja, el método más empleado para obtener el espectro completo a la vez es el de la transformada de Fourier en el que la señal se descompone en una suma de términos de seno y coseno, llamada serie de Fourier.

La espectroscopia FTIR se emplea habitualmente como una técnica cualitativa para identificar los elementos que forman un compuesto de carácter orgánico. Sin embargo, también puede emplearse como una técnica cuantitativa permitiendo determinar, por ejemplo, el grado de ramificación de un polímero o las interacciones específicas que se dan entre los diferentes componentes de una mezcla de polímeros. [1]

En este proyecto se utilizó un equipo que pertenece a los grupos IMEM/PSEP del Departamento de Ingeniería Química. Es un espectrofotómetro modelo “Jasco FTIR-4100” (Figura 3). Este equipo está formado por un accesorio de control térmico y un dispositivo de cristal de diamante (*Golden Gate Heated Single Reflection Diamond ATR, Specac- TeknoKroma*) para registrar los espectros por reflexión en el caso de muestras translúcidas y opacas.



Fig. 3 Espectrofotómetro Jasco FTIR-4100

#### 1.3.4. SEM

Las siglas SEM pertenecen al acrónimo inglés “*Scanning Electron Microscopy*” y en castellano está traducido como microscopio electrónico de barrido. Este tipo de microscopio utiliza un haz de electrones para formar una imagen ampliada de la superficie de la muestra a analizar permitiendo la observación y caracterización superficial de sólidos tanto orgánicos como inorgánicos.

La obtención de imágenes se basa a la recogida de los electrones que emiten las muestras cuando sobre ellas incide un haz de electrones de alta energía en condiciones de vacío. Los electrones emitidos por la muestra son recolectados por los detectores, que producen una señal eléctrica, incidente en una pantalla de tubo de rayos catódicos que reproduce la imagen. El microscopio utilizado en este proyecto fue el Zeiss Neon 40 ubicado en el *Barcelona Research Center in Multiscale Science and Engineering* de la UPC (Figura 4).



Fig. 4 SEM Zeiss Neon 40

### 1.3.5. CV

La voltametría cíclica (CV) es una técnica electroquímica que mide la corriente que se desarrolla en una celda electroquímica en condiciones donde el voltaje es superior al previsto por la ecuación de Nernst. La CV se realiza ciclando el potencial de un electrodo de trabajo y midiendo la corriente resultante.

El potencial del electrodo de trabajo se mide contra un electrodo de referencia que mantiene un potencial constante, y el potencial aplicado resultante produce una señal de excitación. [2]

Un voltamograma cíclico se obtiene midiendo la corriente en el electrodo de trabajo durante los escaneos potenciales.

Los estudios de CV, EIS y de liberación de curcumina (que se verá con posterioridad) se realizaron con un potenciostato-galvanostato, el cual controla con precisión el potencial del electrodo contador (CE) contra el electrodo de trabajo (WE). La diferencia de potencial entre el electrodo de referencia (RE) y el WE, así como la corriente que fluye entre el CE y el WE, están monitorizadas.

El potenciostato-galvanostato empleado en este, trabajo, Autolab PGSTAT101 tiene un total de cinco conectores: WE, CE, RE, S y tierra (Figura 6). El potencial siempre se mide entre el RE (azul) y el S (rojo) y la corriente siempre se mide entre el WE (rojo) y el CE (negro). El conector de tierra (verde) se puede utilizar para conectar dispositivos externos a la misma tierra de la PGSTAT. [3]

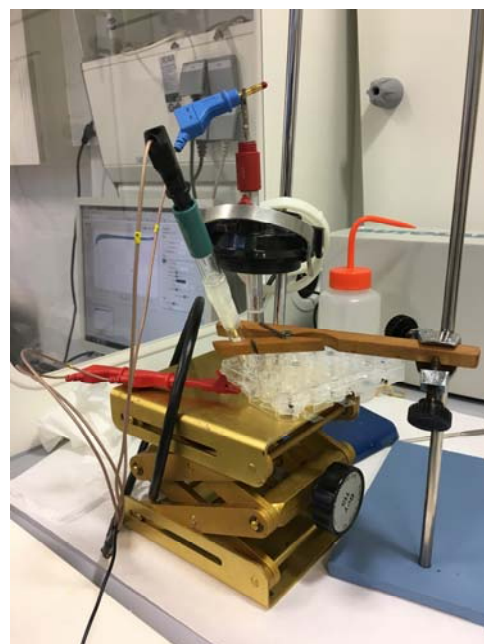


Fig. 5 Montaje CV/EIS

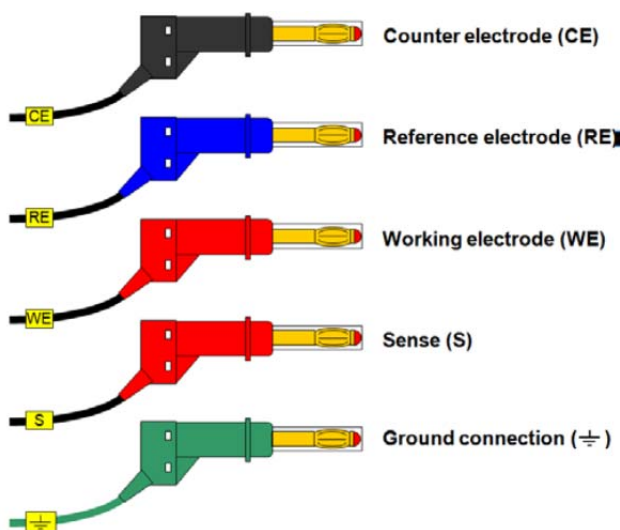


Fig. 6 Conexiones Autolab PGSTAT

### 1.3.6. EIS

El principio de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es aplicar una señal alterna de pequeña amplitud (5 a 20 mV) a un electrodo inmerso en un electrolito, como se observa en la figura 5.

La perturbación inicial aplicada y la respuesta del electrodo se comparan midiendo el desplazamiento de fase de las componentes de corriente y tensión y mediante las mediciones de sus amplitudes. Es importante destacar que la perturbación inicial es un potencial de perturbación ( $\Delta E$ ) de tipo sinusoidal, que debe imponerse en el estado estable del sistema y la respuesta del electrodo es una corriente ( $\Delta I$ ), también sinusoidal, pero con una diferencia de fase ( $\Phi$ ) a la señal aplicada. Por lo tanto, la impedancia que representa  $Z$ , mide la relación entre  $\Delta E$  y  $\Delta I$ . [4]

### 1.3.7. Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica para el estudio de los modos vibracionales, rotacionales y otros de baja frecuencia de sistemas químicos. Se basa en la dispersión inelástica, o dispersión Raman, de la luz monocromática, que por lo general procede de un láser en el rango visible, infrarrojo cercano, o ultravioleta cercano. Las longitudes de onda cercanas a la línea láser, debidas a la dispersión elástica de Rayleigh, son filtradas, mientras que el resto de la luz recogida se dispersa en un detector. La luz láser interactúa con el sistema, por lo que la energía de los fotones láser se desplaza hacia arriba o hacia abajo. [5]

El microscopio Raman utilizado en este proyecto fue el Renishaw inVia Qontor (Figura 7).



Fig. 7 Microscopio Renishaw inVia Qontor



### 1.3.8. Hinchamiento del hidrogel

El hinchamiento de los hidrogeles, conocido como “*swelling*” sirve para determinar la capacidad de estos materiales para retener agua. Esta capacidad está directamente relacionada con el aumento de peso y volumen de estos materiales al hidratarse. En este trabajo, se estudiarán los hidrogeles una vez hinchados y después de ser liofilizados.

### 1.3.9. DLS

La dispersión dinámica de la luz (DLS) es la técnica habitualmente empleada para determinar el perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas en suspensión y el tamaño molecular de los polímeros y sus agregados en solución. La DLS permite, además, analizar las fluctuaciones temporales mediante funciones de autocorrelación de intensidad o fotones. Esta técnica es también conocida como espectroscopia de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi elástica.

En el análisis del dominio del tiempo, la función de autocorrelación generalmente se descompone a partir de un tiempo de retardo cero, y una dinámica más rápida debido a partículas más pequeñas que conducen a una decorrección más rápida de la traza de intensidad dispersa.

La técnica de DLS también se puede utilizar para examinar el comportamiento de fluidos complejos tales como soluciones de polímero concentradas. En este trabajo se ha utilizado el equipo “NanoBrook 90 Plus Zeta”, (Figura 8) y el programa “DLS Particle Sizing Measurment” para poder obtener los diferentes parámetros que se presentarán en capítulos posteriores.



Fig. 8 NanoBrook 90 Plus Zeta

## 2. ETAPA I

El objetivo de esta primera etapa es el de conseguir nanopartículas tanto de PEDOT como de PEDOT con curcumina y caracterizar dichas partículas mediante diferentes técnicas. Se describirá el proceso de síntesis para obtener las nanopartículas y las distintas técnicas de caracterización empleadas.

### 2.1. Materiales y métodos

#### 2.1.1. Reactivos

APS: compuesto inorgánico de fórmula  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  y peso molecular de  $228,2 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ . Es un fuerte agente oxidante cuya función en este proceso será la de iniciar la polimerización del monómero EDOT a PEDOT.

Curcumina: será el fármaco que se encapsulará en las nanopartículas de PEDOT. Tiene un peso molecular de  $368,38 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  y es muy característico su intenso color amarillo. Se utilizará disuelto en etanol a una concentración de  $5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ .

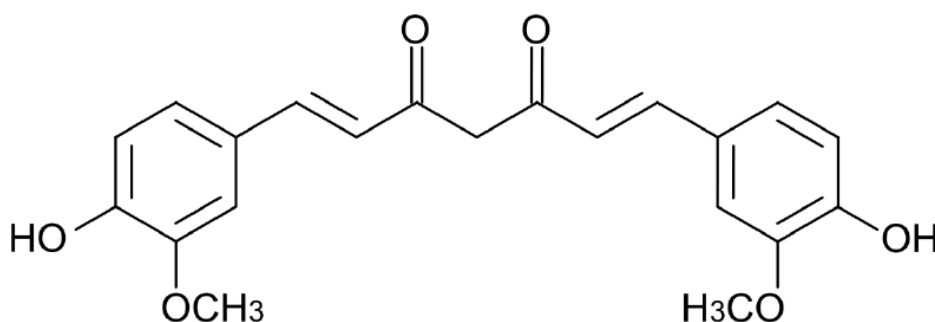


Fig.9 Molécula de curcumina

DBSA: compuesto con una fórmula  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$  y un peso molecular de  $326,49 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ . El DBSA se utilizará a un 70%v v/v en isopropanol debido a su comportamiento como tensioactivo. [6]

EDOT: es el monómero 3,4-etilendioxitiofeno, empleado en la síntesis del polímero. Tiene una masa molecular de  $142,18 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ . El monómero utilizado en este proyecto tiene una del 97% y una densidad de  $1,33 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$ .

### 2.1.2. Síntesis

En este apartado se explican los pasos seguidos para poder obtener PEDOT y PEDOT con curcumina. En una primera fase este proceso se realizó con unas cantidades que posteriormente resultaron ser muy pequeñas, por lo que fue preciso repetir la síntesis multiplicando dichas cantidades por 5. A continuación se describe este último proceso.

Se pesaron los tubos de ensayo adecuados para centrifugar y se les incorporó un imán.

Se añadió 19,79 mL de H<sub>2</sub>O miliQ y 0,117mL de DBSA en cada tubo.

Se dejó en agitación magnética durante 1hora a 750rpm.

A continuación, es preciso señalar la existencia de una pequeña divergencia entre el proceso de formación de PEDOT y de PEDOT con curcumina. Para la formación de nanopartículas de PEDOT se añadieron 91,45μL de EDOT en los tubos de ensayo, y a continuación se añadieron 0,5mL de etanol. Para la preparación de nanopartículas de PEDOT cargadas con curcumina, en vez de añadir 0,5mL de etanol, se adicionó 0,5mL de curcumina disuelta en etanol a una concentración de  $5 \frac{mg}{ml}$ .

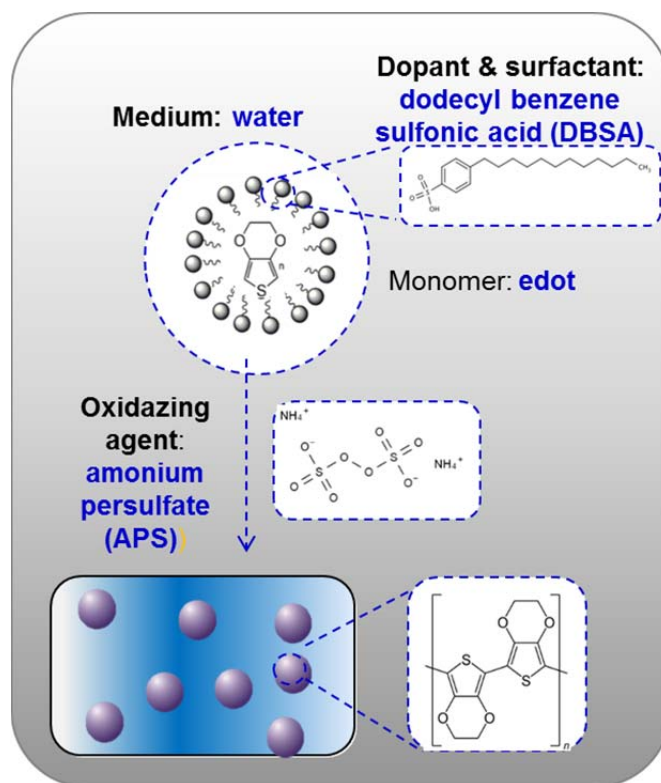


Fig. 10 Mapa síntesis NPs PEDOT

Se recubrieron los tubos de ensayo con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz, que podría oxidar el polímero formado, y se dejó en agitación magnética 1 hora a 750rpm.

Se preparó una disolución de APS en H<sub>2</sub>O miliQ con una concentración de  $182,4 \frac{mg}{ml}$  y se añadió 0,5 mL en cada tubo de ensayo.

Llegados a este punto se preparó un baño y se dejaron reposar las muestras 24 horas a 40°C manteniendo el sistema en agitación magnética a 750rpm.

Pasadas las 24 horas, se retiró el papel de aluminio y mediante el uso de una balanza se equilibraron los pesos de los tubos de ensayo añadiendo H<sub>2</sub>O miliQ al tubo de menor peso. La necesidad de realizar dicho equilibrado surgió como consecuencia que el siguiente paso fue una centrifugación, por lo que era necesario compensar los pesos. [7]

Se realizó una centrifugación a 11000 rpm durante un tiempo de 45 minutos. El rotor empleado es el HB-4 con un radio de 14,61 cm. Este rotor ejerce una fuerza definida por la siguiente ecuación:

$$RFC = 11,17 * r * \left(\frac{N}{1000}\right)^2$$

Ecuación 1 Ecuación fuerza centrífuga

N= velocidad angular en rpm      r= radio en cm

Una vez se realizada dicha centrifugación, mediante el uso de una pipeta Pasteur se extrajo el máximo sobrenadante formado posible teniendo cuidado para no retirar el precipitado.

Se añadió 10 mL de H<sub>2</sub>O miliQ en cada tubo de ensayo y se introdujo en el baño sonicador durante un tiempo de 10 minutos a 30°C.

El baño sonicador es un aparato que, mediante ultrasonidos, permite la homogenización y redispersión de disoluciones.

Pasados los 10 minutos se equilibraron de nuevo los pesos de los tubos de ensayo, y se volvió a centrigrar durante 30 min.

Estos centrifugados se repitieron tres veces.

Una vez realizada la última centrifugación y extraído el máximo sobrenadante posible, se cubrieron los tubos de ensayo con papel y se dejaron en el vacío durante el tiempo necesario para que se evaporase todo el líquido que pudieran contener nuestras muestras (i.e. alrededor de 24-48 horas, en función de la temperatura del laboratorio).

Tras este proceso las partículas de PEDOT y de PEDOT con curcumina estuvieron disponibles para su caracterización.

Para poder cuantificar el rendimiento de este proceso sintético, se pesaron los tubos de ensayo con las nanopartículas de PEDOT y el PEDOT con curcumina. Al conocer el peso de dichos tubos en ausencia de material, fue posible conocer la cantidad de producto formado.

## 2.2. Caracterización

### 2.2.1. FTIR

Mediante los espectros de infrarrojo se pudo ver que la droga permaneció encapsulada en las PEDOT NPs después de los correspondientes lavados. En la figura 11 podemos ver los espectros obtenidos para el monómero EDOT, el PEDOT y la Curcumina juntamente con el espectro de las nanopartículas con la curcumina encapsulada. Los picos relacionados con la droga y el polímero se encuentran superpuestos en la muestra de NPs con curcumina encapsulada. Esto nos indica que algunas moléculas de curcumina permanecen interactuando con las de PEDOT y no se liberan tan fácilmente

Cooncretamente el espectro de PEDOT presenta los picos característicos del grupo etilendioxi C-O-C en las longitudes de onda de 1234 cm<sup>-1</sup> y 1068 cm<sup>-1</sup>. En 1357 cm<sup>-1</sup> se puede observar los enlaces C-C y

C=C del anillo quinoidal del tiofeno mientras que en las longitudes de onda  $989\text{ cm}^{-1}$ ,  $856\text{ cm}^{-1}$ ,  $700\text{ cm}^{-1}$  muestran la presencia del enlace C-S en el anillo del tiofeno.

El espectro correspondiente a las partículas de PEDOT muestra los principales picos correspondientes al tiofeno, éter y los grupos sulfatos, modos de estiramiento del enlace C-C en el anillo del tiofeno en  $1647\text{ cm}^{-1}$  y  $1557\text{ cm}^{-1}$ , modos de estiramiento de  $\text{CH}_2$  en  $1478$ ,  $1396$  y  $750\text{ cm}^{-1}$ . También presenta vibraciones del enlace C-O-C en  $1206$  y  $1057\text{ cm}^{-1}$  y el estiramiento S-O en  $667\text{ cm}^{-1}$ .

El hecho de haber añadido la curcumina durante la polimerización del PEDOT no ha afectado a la localización de las bandas correspondientes al PEDOT, es más, también se pueden apreciar las bandas asociadas con el espectro de la droga sola, demostrando así su presencia en las NPs de PEDOT. Las dos bandas características a los enlaces C=O en  $1626$  y  $1535\text{ cm}^{-1}$  y el pico correspondiente al C-O enólico en  $1267\text{ cm}^{-1}$  observados para las NPs de curcumina, también se han podido detectar en las NPs de PEDOT/CUR (Figura11). De igual forma sucede con el ancho de banda en  $3293\text{ cm}^{-1}$  y el intenso pico en  $3508\text{ cm}^{-1}$  que indica la presencia de OH, mientras que los picos encontrados en  $959$  y  $713\text{ cm}^{-1}$  han sido atribuidos a las vibraciones trans- y cis-CH del grupo benzoato respectivamente. [7][8][9].

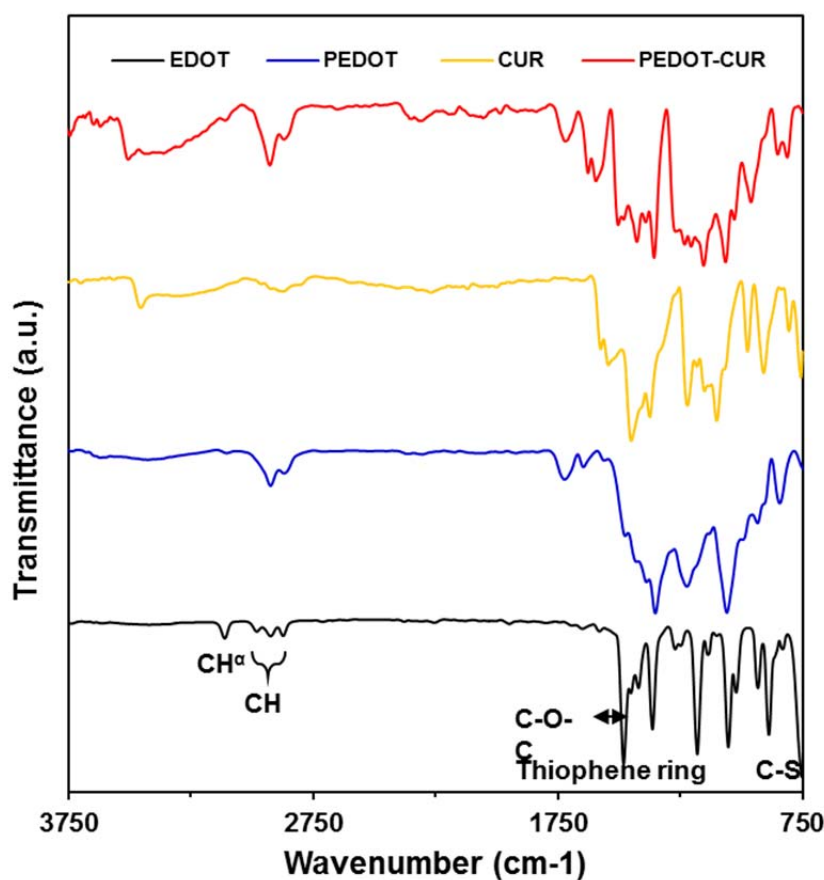


Fig. 71 Espectros FTIR obtenidos para el EDOT, la curcumina, las NPs de PEDOT y las NPs de PEDOT con curcumina

### 2.2.2. Curva patrón

Para realizar la curva patrón se siguieron los siguientes pasos:

Se diluyó la curcumina desde una concentración de  $5 \frac{mg}{ml}$  a concentraciones de 0,1 - 0,05 - 0,025 - 0,0125 - 0,00625 -  $0,003125 \frac{mg}{ml}$ . Para cada concentración se prepararon tres muestras independientes de 200  $\mu L$ .

A continuación dispersaron las muestras de PEDOT y PEDOT con curcumina en  $H_2O$  miliQ para obtener una concentración de  $10 \frac{mg}{ml}$ . Se introdujeron las muestras en el sonicador durante 40 min a 30°C para conseguir la máxima homogeneidad posible.

Una vez sonicadas, se diluyeron en un eppendorf 2,5  $\mu L$  de muestra en 500  $\mu L$  de etanol y las volvieron a sonicar durante 5 minutos. Transcurridos este tiempo se centrifugaron los eppendorf a las

máximas revoluciones posibles y se pipetearon 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra para ponerlas en la placa donde se realizará la lectura de absorción.

Las lecturas de absorbancia para la curva patrón se realizaron a una longitud de onda de 450nm, tal y como indica la bibliografía.

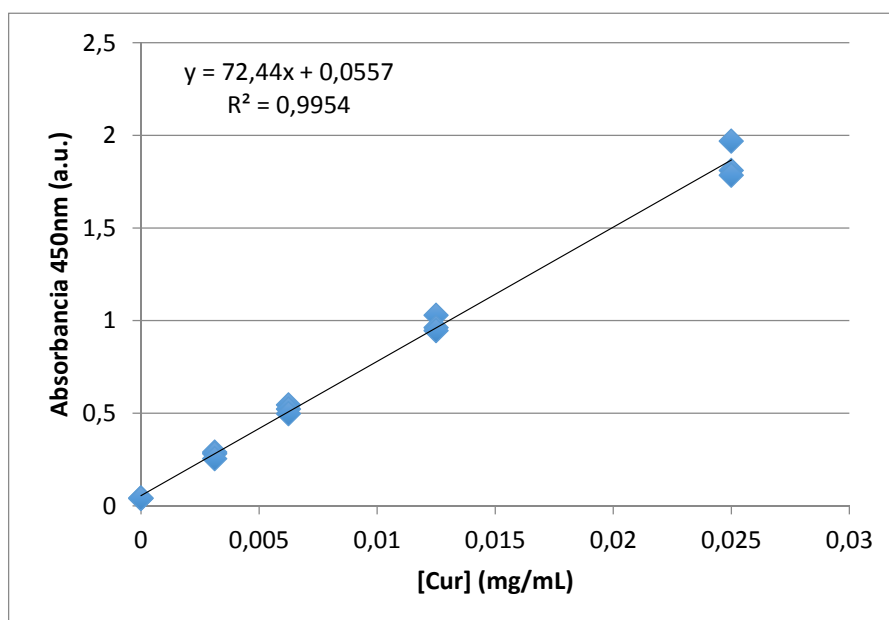


Fig. 12 Recta de calibrado sin intersección (0,0)

En la figura 10 se puede observar la relación obtenida entre la absorbancia y la concentración de la curcumina. Se obtuvo un valor de  $R^2 = 0.9954$ , por lo que se consideró una recta válida para hacer aproximaciones lineales. La ecuación correspondiente al calibrado fue:

$$\text{Absorbancia} = 72.44 [\text{Cur}] + 0.0557$$

Ecuación 2 Recta de calibrado sin intersección (0,0)

Tabla 1 Valores obtenidos para NPs de PEDOT/CUR

P	PC	(PC-P)	mg/ml	mg/ml	EE (%)	wt/wt(%)
0.065	1.279	1.214	0.01598978	3.1995693	51.2	32

En la tabla (1) se muestran los resultados obtenidos para las muestras de PEDOT (P) y de PEDOT con curcumina (PC). A la absorbancia del PEDOT con la curcumina se le sustrajo la absorbancia del PEDOT, lo cual permitió determinar la cantidad de curcumina incorporada durante el proceso de síntesis. Utilizando la ecuación 1 obtenida para calcular la relación entre la absorbancia y la concentración de

la curcumina, se concluyó que la concentración de curcumina en las muestras, estando diluidas era de  $0.0159 \frac{mg}{ml}$ . Aplicando las diferentes conversiones necesarias para calcular la concentración real en las nanopartículas sintetizadas, se determinó una concentración de  $3.1979 \frac{mg}{ml}$ . Este último valor se ha empleado como referencia para posibles cálculos.

Con dicho valor de concentración se obtuvo la cantidad de curcumina presente en las nanopartículas de PEDOT con curcumina para así poder calcular la eficiencia de encapsulación (EE) y porcentaje en peso respecto al total.

Por otro lado, se decidió realizar una segunda recta de calibrado sin término independiente para facilitar la realización de cálculos posteriores. Obviamente, la consideración del término independiente únicamente afecta a las muestras con absorbancias muy pequeñas. Con el objetivo de evitar resultados sin sentido físico en caso de obtenerse absorbancias muy pequeñas, se decidió emplear la ecuación que se muestra en la Figura 13.

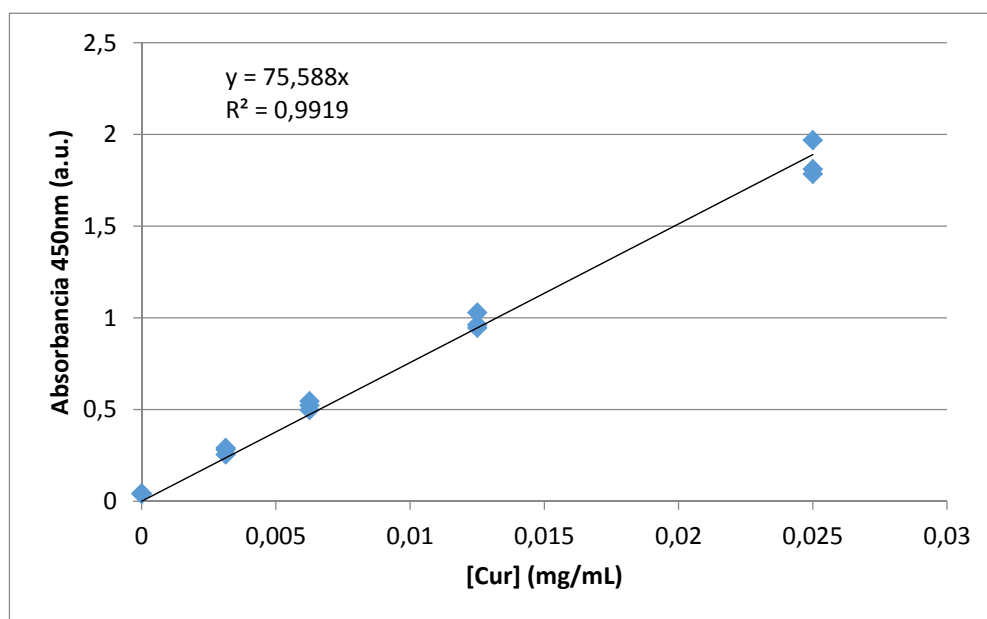


Fig. 83 Recta de calibrado con intersección (0,0)



### 2.2.3. SEM

Una vez comprobada y analizada la incorporación de la droga en las NPs de PEDOT estudiamos la morfología de las PEDOT NPs y las PEDOT/CUR NPs mediante SEM (Figura 14). Se confirma la presencia de partículas esféricas en ambos casos. Estas imágenes revelan de una manera clara la existencia de diferencias entre las NPs de PEDOT con y sin curcumina. En las NPs de PEDOT se puede apreciar una homogeneidad con respecto al diámetro de las partículas y con poco espacio entre ellas, presentan una tendencia a aglomerar. En cambio para el caso de las NPs de PEDOT con curcumina se puede observar una mayor polidispersidad, variedad en los diámetros de las partículas, lo que revela la existencia de diferentes tamaños de partículas dentro de la misma muestra. En las imágenes también se puede observar como las NPs de PEDOT/CUR ( $\phi = 158 \pm 29$  nm) son de mayor tamaño que las de PEDOT ( $\phi = 99 \pm 21$  nm).

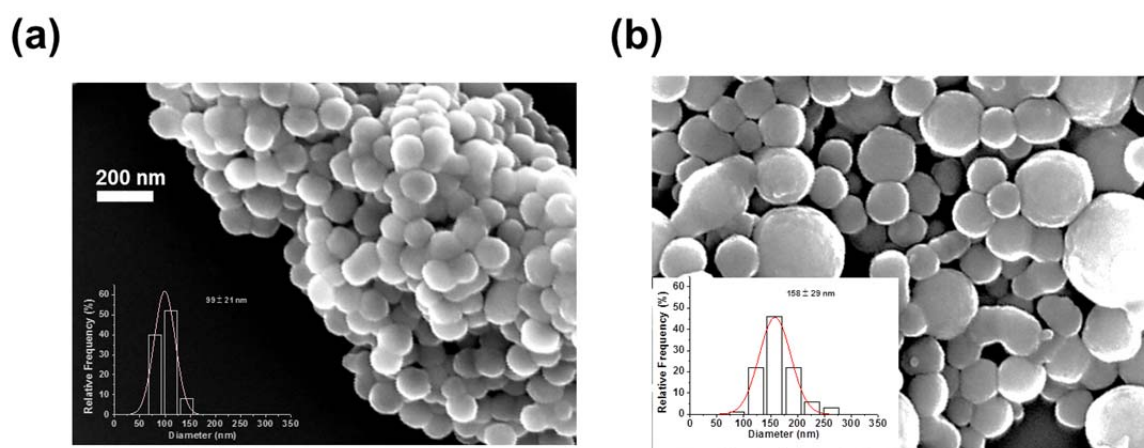


Fig. 14 (a) NPs PEDOT (b) NPs PEDOT/CUR

### 2.2.4. DLS

La realización del DLS confirmó las diferencias visualizadas en el SEM. La media del diámetro hidrodinámico efectivo correspondiente a las nanopartículas de PEDOT/CUR ( $284.3 \pm 13.6$  nm) es mayor que el correspondiente a las de PEDOT ( $157 \pm 0.9$  nm). También se determinó que la dispersión correspondiente al tamaño medio de las partículas era mayor en las NPs de PEDOT/CUR con respecto al PEDOT, lo que significa que en las NPs partículas de PEDOT se encontraron diámetros de partícula similares entre si mientras que en las partículas de PEDOT/CUR había mayor variedad.

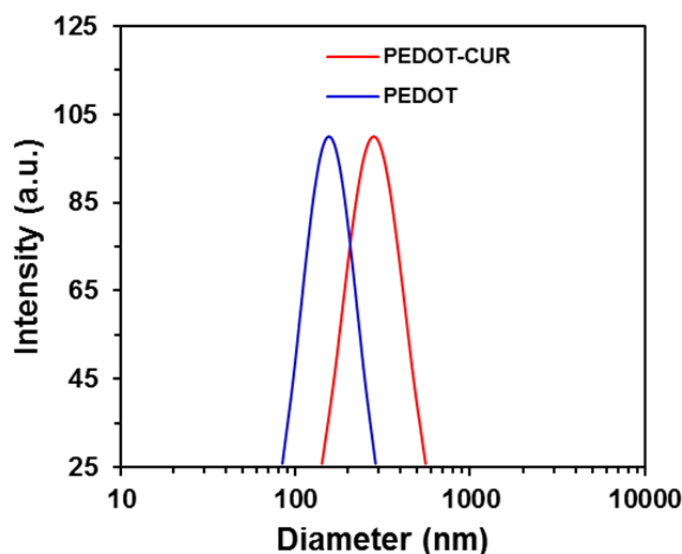


Fig. 95 Diámetro en suspensión de las partículas

Además se determinó el potencial-Z de las NPs. Este es el potencial en el plano de deslizamiento de una partícula coloidal moviéndose bajo un campo eléctrico. Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático.

Los resultados obtenidos muestran que el grado de repulsión entre las nanopartículas de PEDOT con curcumina ( $-30 \pm 3.5$  mV) es mayor que en el PEDOT ( $-25.5 \pm 5.8$  mV). El hecho de haber obtenido un potencial en valor absoluta mayor que 30 para las NPs de PEDOT con curcumina indica que el coloide formado es altamente estable, mientras que para el PEDOT es moderadamente estable. Otro aspecto a comentar es el signo obtenido, debido a que las partículas estaban rodeadas de DBSA, un ácido, el potencial ha salido negativo. Los valores obtenidos aparecen resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2 Diametro efectivo y potencial-Z obtenidos

	PEDOT NPs	PEDOT-CUR NPs
Eff. Diam.	$157 \pm 0.9$	$284.3 \pm 12.6$
Z-pot	$-25.5 \pm 5.8$	$-30.2 \pm 3.5$

### 3. ETAPA II

En la segunda etapa se incorporaron las nanopartículas de PEDOT y de PEDOT con curcumina a un hidrogel de PGA. Los sistemas resultantes se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas, electroquímicas y de microscopía

#### 3.1. Materiales y métodos

##### 3.1.1. Reactivos

Además de los reactivos para la formación de las nanopartículas de PEDOT y de PEDOT con curcumina, se necesitaron los reactivos requeridos para la síntesis del hidrogel

PGA: Ácido poli- $\gamma$ -glutámico proveniente de biosíntesis y peso molecular entre 200000-500000  $\frac{g}{mol}$

EDC: *N*-Etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidroclicorada, que se emplea como agente activador.

Cystamina dihidroclicorada: que actua como agente entrecruzante.

PET-ITO: Oxido de indio y estaño recubierto de poli(etilen tereftalato) para caracterizar electroquímicamente los hidrogeles preparados.

##### 3.1.2. Síntesis

Se preparó una solución 0,5M de NaHCO<sub>3</sub> disolviendo 0,42 g de NaHCO<sub>3</sub> en 10 mL de H<sub>2</sub>O miliQ.

La síntesis del hidrogel de PGA se realizó a 4°C en un baño de hielo. El hidrogel se sintetizó en cinco pasos a partir de 1 mL de solución de NaHCO<sub>3</sub>:

- 1- Se preparó una solución 0,5M de PGA. Para ello se dejó 0.0716 g de PGA en agitación y se añadió 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M, dejándose nuevamente el sistema en agitación (500 rpm) durante 10 min.
- 2- Se añadió la cantidad necesaria de EDC (0,1188 g) para obtener una solución 0,4 M de con respecto a 1 mL de disolución inicial. El sistema se dejó en agitación a 4 °C durante 2 min.
- 3- Se incorporó la cantidad necesaria de cystamina (0.04504 g) para obtener una solución 0,2 M con respecto 1 mL de disolución inicial.

- 4- Tras haber añadido la cistamina se esperó 30 minutos. Durante este periodo de tiempo, se formaron los entrecruzamientos entre las cadenas de PGA, lo que dio lugar a la gelificación.
- 5- Transcurridos 30 minutos, se realizaron tres lavados del hidrogel con PBS, de 20 minutos cada uno. Finalmente, el hidrogel se dejó 24 h en la nevera inmerso en 1mL de PBS.

El método explicado anteriormente sirve para la síntesis de hidrogel sin nanopartículas de PEDOT o PEDOT con curcumina. Para cargar dichas nanopartículas en el hidrogel se debe modificar el paso 1) de la siguiente forma:

En vez de añadir 1 mL de  $\text{NaHCO}_3$  se añadió 1 mL de nanopartículas (20% w/w) +  $\text{NaHCO}_3$ .

Para ello se incorporaron 14,32 mg de nanopartículas a 1 mL de  $\text{NaHCO}_3$ . La dispersión resultante se introdujo en el baño sonicador durante 30 min a 40 °C para conseguir la máxima homogeneidad. A continuación, la síntesis del hidrogel se continuó siguiendo con el paso 2).

Como sistema control también se preparó hidrogel de PGA cargado con curcumina (i.e. sin nanopartículas). El proceso seguido fue análogo al descrito anteriormente, si bien la cantidad de curcumina añadida al  $\text{NaHCO}_3$  en el paso 1) de síntesis fue de 3.2 mg. Esta se corresponde aproximadamente con la cantidad de curcumina cargada en las nanopartículas de PEDOT.

### 3.2. Caracterización

Para caracterizar correctamente los hidrogeles preparados mediante técnicas electroquímicas, se realizaron unos orificios de aproximadamente 4mm de diámetro a unas celdas. En el fondo de dichas celdas se engancharon unas tiras de PET-ITO para transmitir la corriente a los hidrogeles ensayados.

Para ello se cortó el PET-ITO en tiras de  $4 \times 1 \text{ cm}^2$ , las cuales fueron lavadas tres veces. El primer lavado (5 min) se realizó con  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ, el segundo (5 min) con acetona y el tercero (5 min) con etanol.

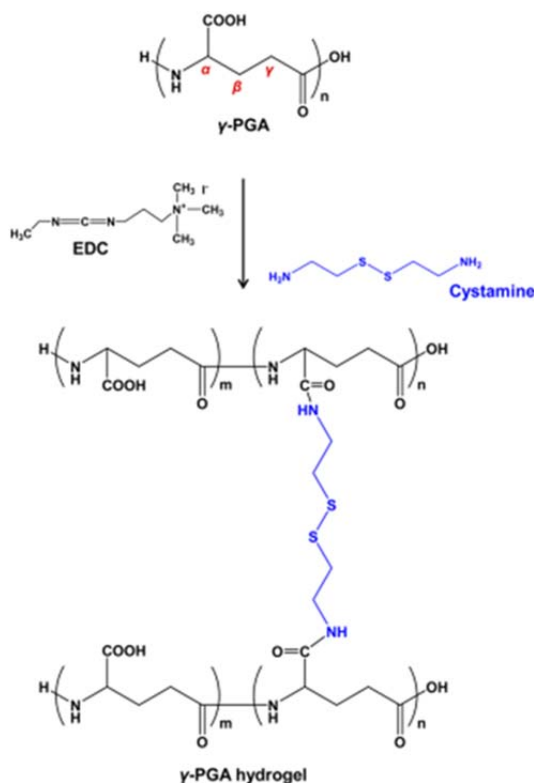


Fig. 10 Esquema síntesis hidrogel

Para enganchar las tiras de PET-ITO a la base de la celda se utilizó silicona caliente, evitando así cualquier tipo de fuga entre la celda y el PET-ITO. En la figura 17 se puede apreciar el montaje.



Fig. 17 Montaje de las celdas con PET-ITO

Por otro lado, de aquí en adelante, se emplearán las siguientes abreviaturas para referirse a los materiales preparados: PGA-CUR (hidrogel de PGA cargado con curcumina), PGA-PEDOT (hidrogel de PGA cargado con nanopartículas de PEDOT) y PGA-PEDOT/CUR (hidrogel de PGA cargado con nanopartículas de PEDOT con curcumina).

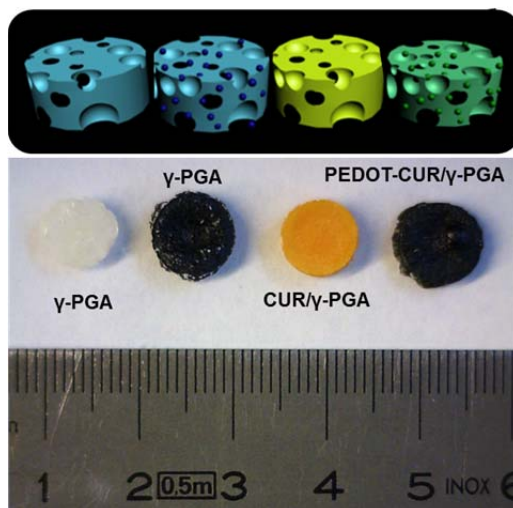


Fig. 18 Hidrogeles sintetizados

### 3.2.1. FTIR

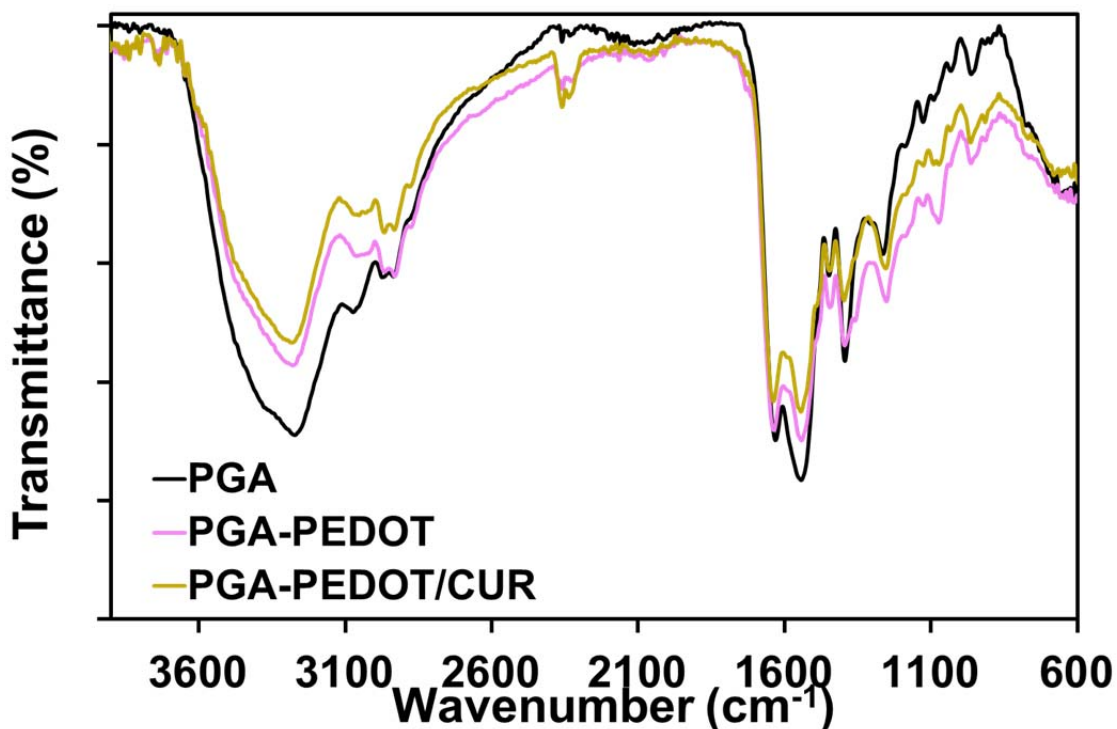


Fig. 119 IR de los hidrogeles cargados con NPs

Una vez las partículas fueron incorporadas en los hidrogeles de PGA estos fueron caracterizados. La figura 19 muestra el espectro FTIR del PGA, PGA-PEDOT y PGA-PEDOT/CUR. En estos tres espectros se pueden observar las bandas típicas de transmisión tal como identificó Pérez Madrigal [10].

La presencia de las partículas de PEDOT en los hidrogeles se debería verse levemente reflejada en la aparición de la vibración en  $1090\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al C-O-C, como también el estiramiento del etilendioxo en  $1180\text{ cm}^{-1}$ .

Debido al solapamiento del PGA en los espectros, no se pudo determinar correctamente la presencia del PEDOT o la curcumina en los hidrogeles y se decidió complementar con otras técnicas.

### 3.2.2. RAMAN

Los distintos hidrogeles y materiales también se caracterizaron mediante RAMAN. En la figura 20 se muestran los espectros obtenidos. El PEDOT presenta sus picos característicos que se encuentran en  $983$ ,  $1085$ ,  $1255$ ,  $1365$ ,  $1430$  y  $1485\text{ cm}^{-1}$ . A  $983\text{ cm}^{-1}$  se presenta la vibración correspondiente al enlace C-S del tiofeno. El estiramiento del grupo etilendioxo se ve reflejado en  $1085\text{ cm}^{-1}$ . La presencia

del enlace C-C se ve reflejada en  $1363\text{ cm}^{-1}$  mientras que en  $1430\text{ cm}^{-1}$  el enlace simétrico C=C y en  $1485\text{ cm}^{-1}$  el enlace asimétrico C=C.

Para la curcumina se observa una intensa banda en  $1601\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones de los enlaces C=C del anillo aromático. [7][8]

Para el espectro del PGGA se puede observar una banda en torno a  $3150\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo amino. También se puede apreciar un pico en torno los  $1610\text{ cm}^{-1}$  debido a la presencia de un ácido carboxílico.

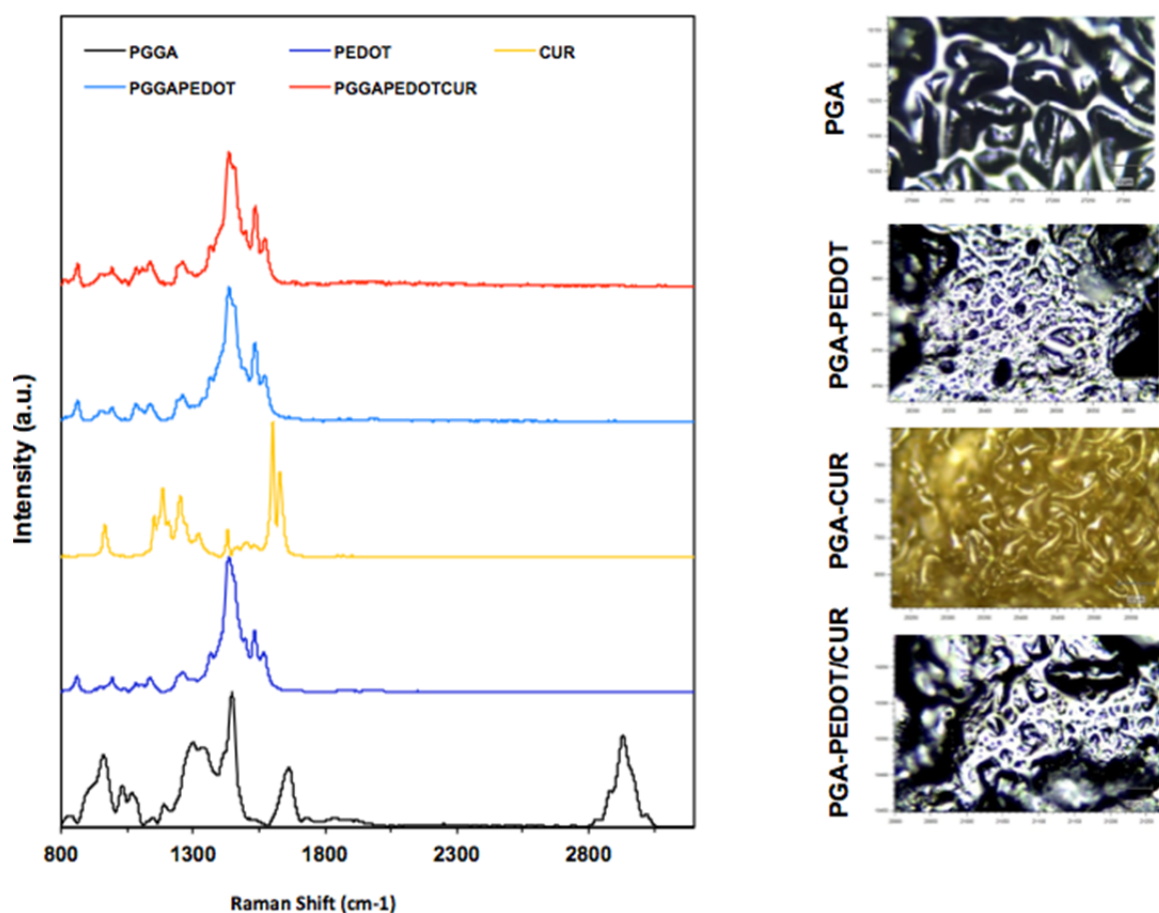


Fig. 12 Resultados Raman e imágenes microscopio de PGA, PGA-CUR, PGA-PEDOT y PGA-PEDOT/CUR

### 3.2.3. EVALUACIÓN DEL HINCHAMIENTO DEL HIDROGEL

Los valores de hinchamiento para PGA-PEDOT y PGA-PEDOT/CUR se obtuvieron a partir de los siguientes cálculos

PGA-PEDOT hidratado: 0.441 gr

PGA-PEDOT deshidratado: 0.0349 gr

$$SW = \frac{0.441 - 0.0349}{0.0349} * 100 = 1163.31\%$$

PGA-PEDOT/CUR hidratado: 0.3936 gr

PGA-PEDOT/CUR deshidratado: 0.0439 gr

$$SW = \frac{0.3936 - 0.0439}{0.0439} * 100 = 796.58\%$$

Estos valores de hinchamiento reflejan la gran capacidad de estos hidrogeles para aumentar su peso, y en consecuencia su volumen. En el caso de PGA-PEDOT aumenta su peso más de un 1000%, mientras que en el caso de PGA-PEDOT/CUR casi un 800%. Esta diferencia entre los dos puede ser debida a que el hidrogel cargado con PEDOT/CUR, al contener más partículas, pueda ser menos poroso y estar más que el cargado con PEDOT.

### 3.2.4. UV-VIS

Finalmente, de manera espectroscópica, se caracterizaron los diferentes hidrogeles y materias (PEDOT y curcumina) con UV-VIS. Los hidrogeles liofilizados fueron mezclados con bromuro de potasio y se formaron pastillas ultra-finas para el estudio. En la Figura 21 se pueden observar los espectros obtenidos. Como era de esperar la curcumina presenta un pico a una longitud de onda cercana a los 450 nm y el PEDOT próximo a los 800 nm. . El valor de longitud de onda que se ha utilizado previamente para las curvas patrón de la droga está cerca del máximo observado para la curcumina. Por otro lado, tal y como era de esperar las NPs de PEDOT cargadas con curcumina también presentan un pico de absorbancia a una longitud de onda cercana a los 450 nm, confirmando la incorporación de la curcumina y un pico menor a 800 nm mostrando la presencia de PEDOT. Por lo contrario, el pico a 450 nm no se observó en las NPs de PEDOT sin curcumina .



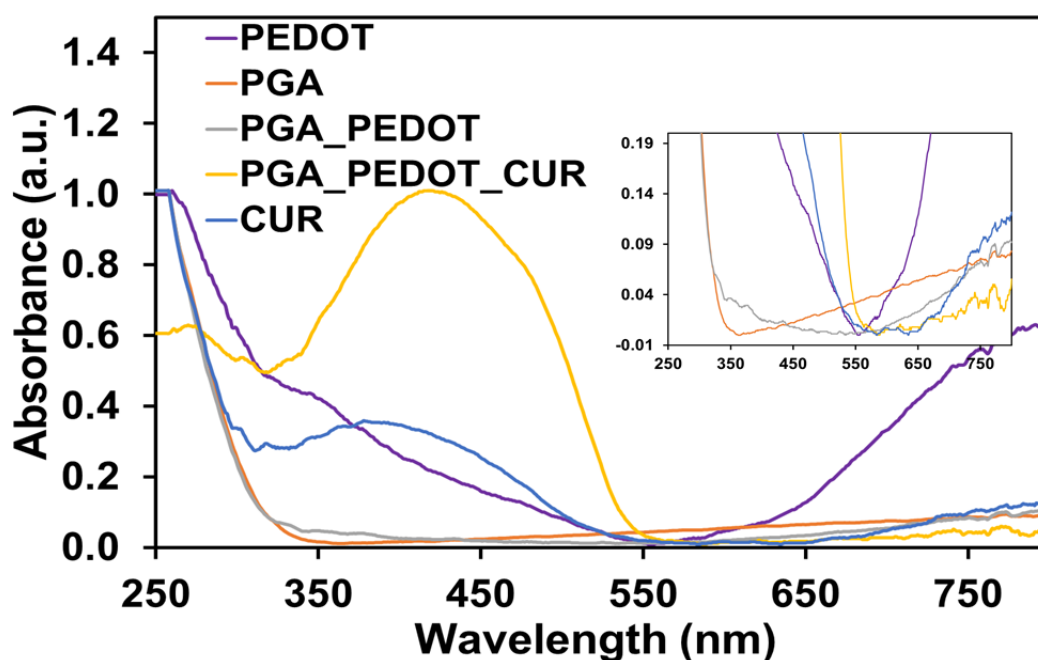


Fig. 13 Espectros UV-Vis obtenidos para la curcumina, NPs de PEDOT y NPs de PEDOT con curcumina

### 3.2.5. SEM

Los distintos hidrogeles fueron crio-fracturados y liofilizados para poder estudiar tanto la morfología externa como interna del material. De esta manera, se obtuvieron las micrografías denominadas como “*cross-section*” (sección transversal) y “*top-section*” (sección frontal) mostradas en la Figura 22.

En general, tal como se puede ver en las imágenes obtenidas en el SEM (Figura 22), la superficie de los hidrogeles es rugosa y prácticamente no porosa. En cambio, las secciones transversales presentan una gran porosidad. Se pudo calcular el diámetro medio de los poros con su respectiva desviación estándar. En el PGA se observó un diámetro medio de  $351,7 \pm 141,9 \mu\text{m}$ , siendo el hidrogel con menor porosidad pero presentando los poros de mayor tamaño. Los poros del PGA-PEDOT tuvieron un tamaño medio de  $295,4 \pm 62 \mu\text{m}$  mientras que para el PGA-CUR se observaron unos poros de longitud media  $172,3 \pm 104 \mu\text{m}$  y los del PGA-PEDOT/CUR de  $294,15 \pm 92,8 \mu\text{m}$ .

Si a la imagen del PGA-PEDOT se le incrementa mucho el aumento, se pueden diferenciar claramente las nanopartículas de PEDOT del resto del hidrogel, última micrografía.

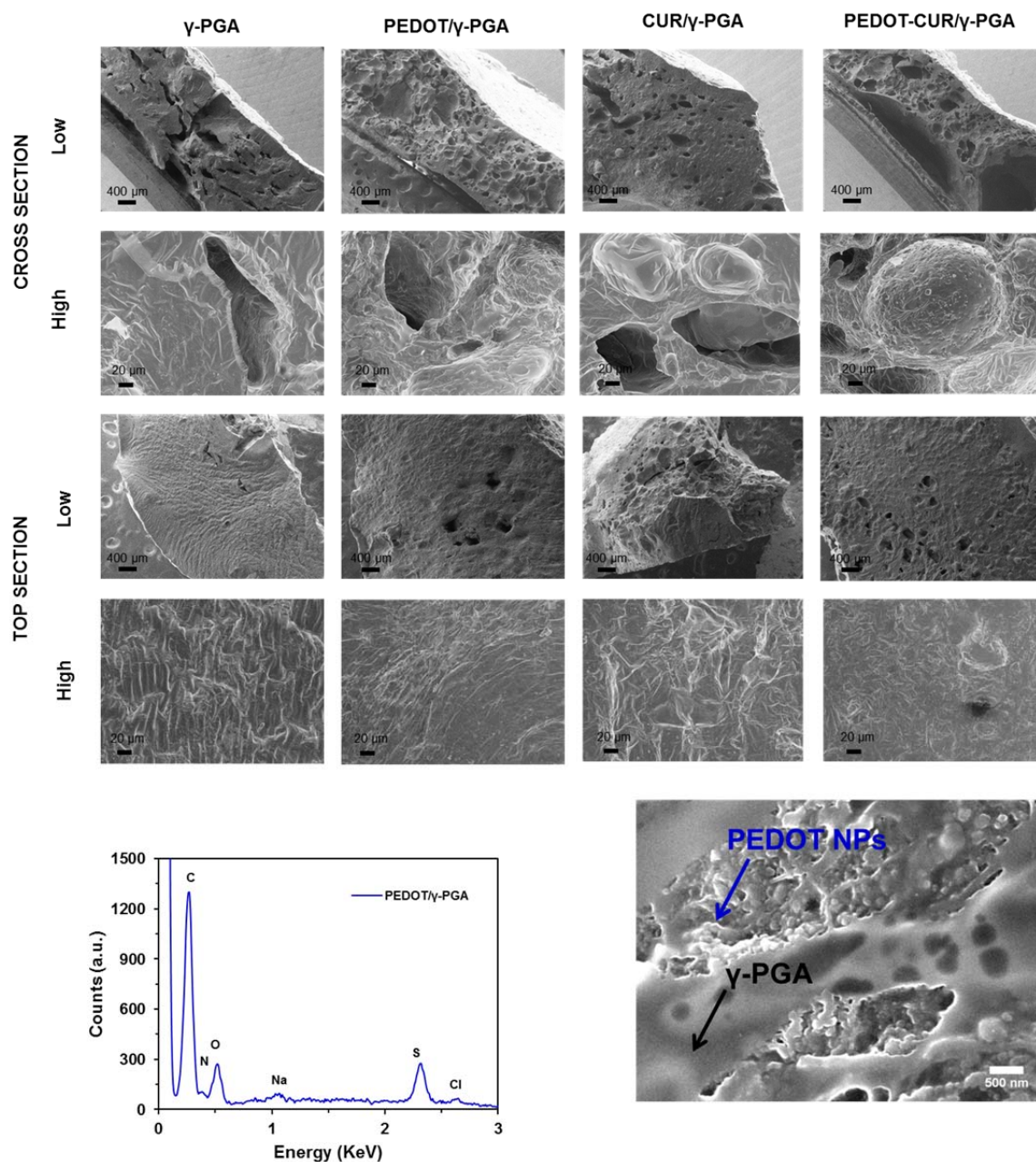


Fig. 14 Imágenes SEM de PGA, PGA-CUR, PGA-PEDOT y PGA-PEDOT/CUR

Además de las imágenes obtenidas por SEM, también se realizó un análisis de elementos que proporcione información sobre la composición del hidrogel con PEDOT NPs. Este análisis concluyó la existencia de azufre, carbono, nitrógeno, oxígeno, cloruro y sodio. El azufre está presente debido a la cistamina empleada en la preparación de los hidrogeles y también está presente en el PEDOT, el nitrógeno está presente debido al ácido poliglutámico, el carbono y el oxígeno están presentes en la mayoría de las sustancias utilizadas para la síntesis de los hidrogeles mientras que la presencia de cloruro y sodio es debido a las sales del buffer.

### 3.2.6. CV

Para evaluar el efecto electroquímico de la incorporación de PEDOT y PEDOT/CUR NPs en el hidrogel se realizaron diez voltametrías cíclicas seguidas en cada una de las muestras. El área de estas CVs es mayor comparadas con el hidrogel solo (datos no mostrados), indicando un aumento de compuestos electroactivos en el material. Concretamente la figura 23 compara los voltagramas obtenidos para PGA-PEDOT y PGA-PEDOT/CUR en el primer ciclo de voltametría y el décimo. En ambas voltametrías, se puede observar una disminución de la electroactividad entre el primer y décimo ciclo, ya que los picos de oxidación son inferiores, así como el área de los voltagramas. Comparando los voltagramas obtenidos para el PGA-PEDOT/CUR y el PGA-PEDOT se ve reflejado en el área que la electroactividad del PGA-PEDOT es superior a la del PGA-PEDOT/CUR.

La estabilidad electroquímica fue examinada evaluando la pérdida de electroactividad (LEA, en %) versus el número de ciclos redox:

$$LEA(\%) = \frac{\Delta Q}{Q_i} = \frac{Q_i - Q_f}{Q_i}$$

Donde Q es el promedio entre la carga de oxidación y la de reducción en valor absoluto y en la fórmula para calcular el LEA los subíndices indican inicial (primer ciclo) o final (último ciclo).

Para el PGA-PEDOT/CUR se obtuvo un LEA de 43,97% entre el primer y el último ciclo mientras que para el PGA-PEDOT el valor obtenido fue del 23,3%. Indicando así, que la incorporación de PEDOT NPs presenta un material electroquímico más estable frente a los procesos de oxidación i reducción que cuando se incorporan PEDOT/CUR NPs.

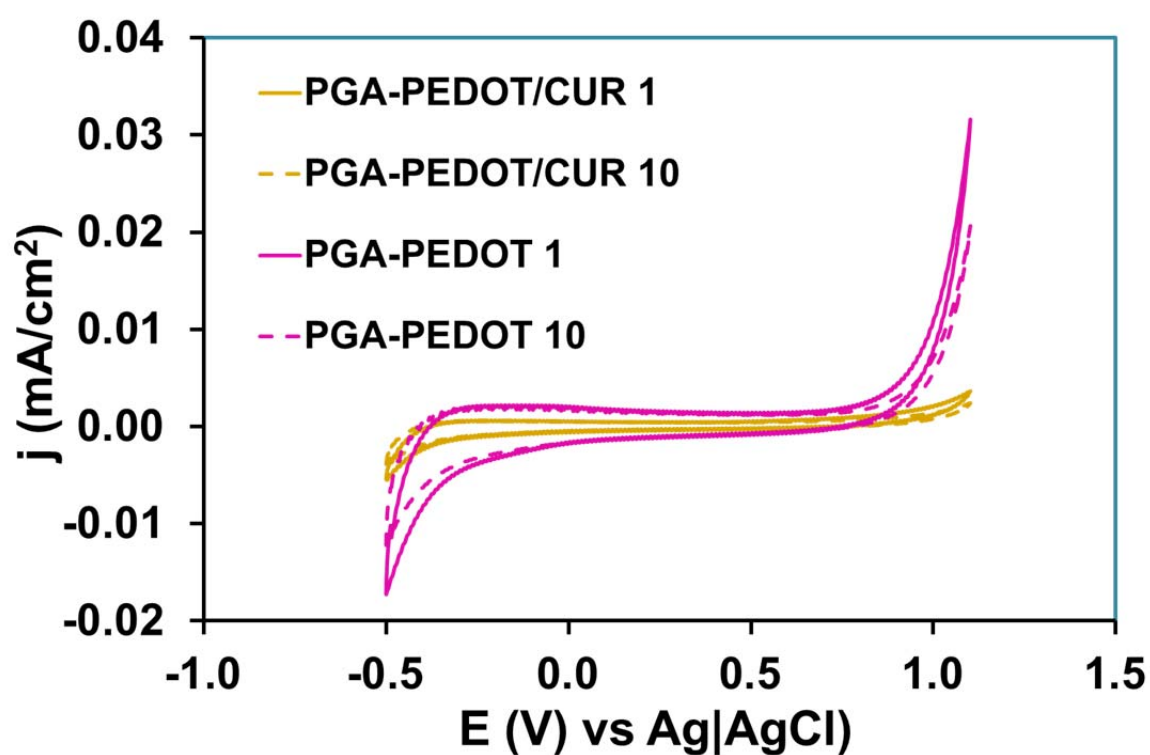


Fig. 23 Ciclos 1 y 10 de PGA-PEDOT y PGA-PEDOT/CUR

### 3.2.7. EIS

Los resultados obtenidos mediante la técnica de EIS se discutirán en el siguiente Capítulo junto a los de la etapa III.

## 4. ETAPA III

En esta última etapa, la más extensa, se realizó un estudio de los hidrogeles sintetizados en la etapa II pero habiendo incrementado la carga de polímero conductor en su interior. Más concretamente, con el objetivo de incrementar la electrosensibilidad de los hidrogeles cargados con nanopartículas de PEDOT y PEDOT con curcumina, se realizó una electropolimerización in situ fijando los hidrogeles al electrodo, sumergiéndolos en un medio de reacción y aplicando un potencial constante. Además de los análisis hechos en la etapa II, también se examinará la respuesta de estos hidrogeles cuando se aplican estímulos eléctricos.

### 4.1. Síntesis

Para poder realizar la electropolimerización in situ en los hidrogeles cargados tal y como se describió en la etapa II, fue preciso alterar el último paso de síntesis. Concretamente, en vez de dejar los hidrogeles reposar en PBS durante la noche, se dejaron en reposo en una disolución acuosa de EDOT-OH. Este monómero, está funcionalizado con un grupo hidroximetil en el anillo de dioxano del EDOT, lo que confiere solubilidad en agua. Transcurrido este tiempo, se aplicó un potencial de 1.10 V hasta que la carga de polimerización alcanzo un valor de 0.02C.

La solución de EDOT-OH se preparó usando H<sub>2</sub>O miliQ con 10 mM de LiClO<sub>4</sub> y 0.1 M de monómero.

En adelante los hidrogeles PGA-PEDOT y PGA-PEDOT/CUR que hayan experimentado electropolimerización in situ se abreviarán PGA-PEDOT-PEDOT-OH y PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH.

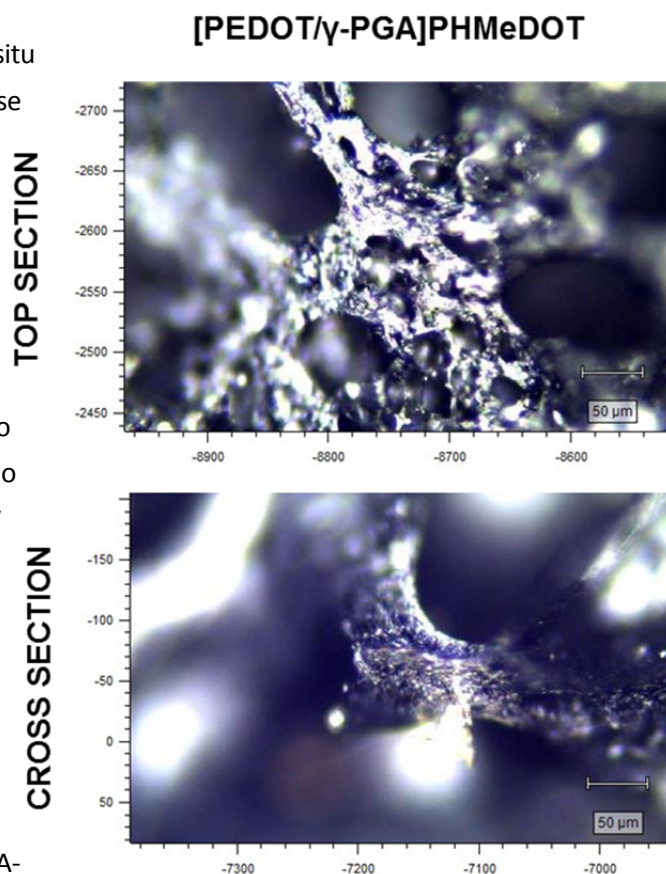


Fig. 15 Imágenes microscopio óptico

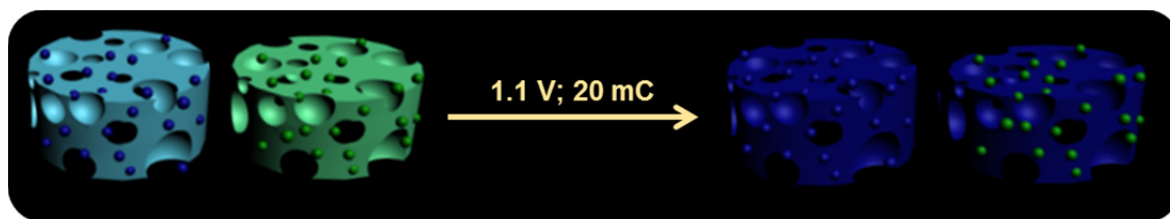


Fig. 16 Esquema de electropolimerización in situ de los hidrogeles de PGA cargados con nanopartículas

## 4.2. Caracterización

### 4.2.1. FT-IR

El resultado de la electropolimerización de PEDOT-OH en los hidrogeles con PEDOT y PEDOT/CUR NPs se ve reflejado en una mejora de la visibilidad de los picos relacionados con el PEDOT respecto al espectro sin electropolimerizar.

Concretamente, se puede observar un amplio pico que presentan los tres espectros alrededor de  $3298\text{ cm}^{-1}$  debido a la superposición de los estiramientos N-H y O-H. Los picos apreciados también en los tres espectros en  $1530$ ,  $1575$  and  $1729\text{ cm}^{-1}$  están asociados a procesos de oxidación.

El PEDOT OH muestra un intenso pico alrededor de  $1100\text{ cm}^{-1}$  debido al grupo etilendioxi, mientras que el PPCP muestra dos bandas características a los enlaces C=O en  $1626$  y  $1535\text{ cm}^{-1}$ .

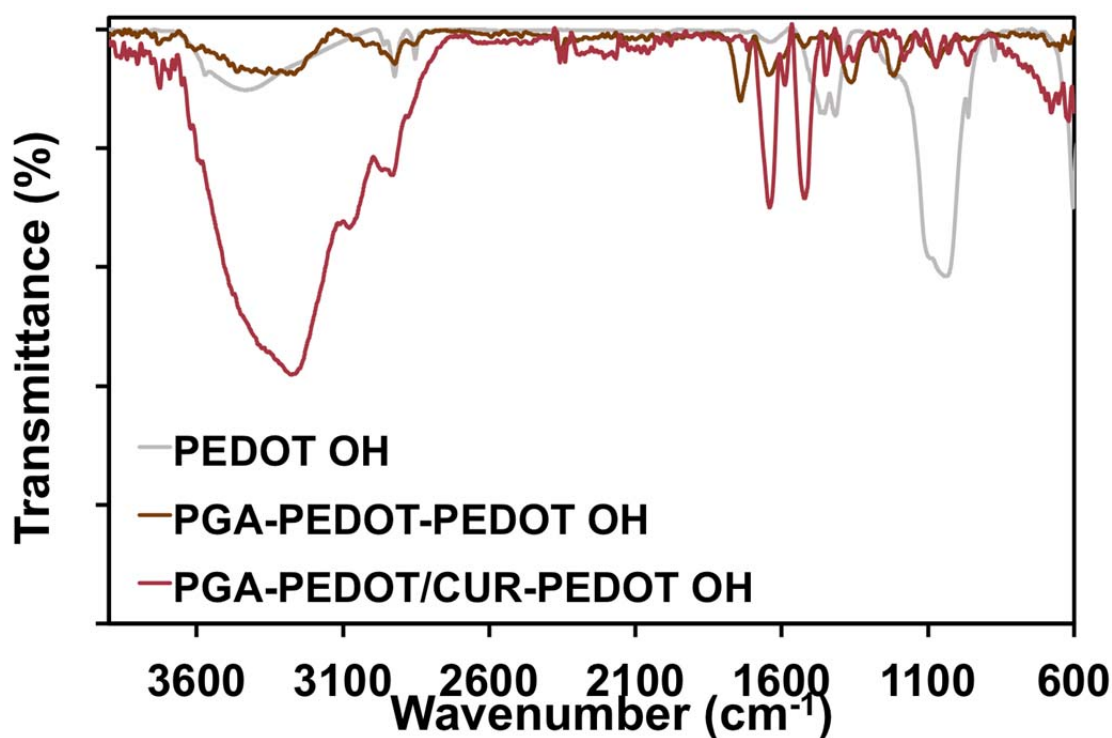


Fig. 176 Espectros IR hidrogeles electropolimerizados



#### 4.2.2. CV

En los voltagramas obtenidos tanto para los hidrogeles electropolimerizados, tanto de PEDOT como de PEDOT con curcumina se puede observar dos picos de oxidación. El primero se encuentra en 0,5V mientras que el segundo pico se superpone con el potencial de oxidación del medio. También han sido detectados dos picos de reducción, indicando la presencia de pares redox en el rango del potencial escaneado. Estos procesos redox, que se pueden observar claramente en los voltagramas, están atribuidos a la formación de polarones en las cadenas de polímero conductor.

Comparando las áreas de los voltagramas, se observa la disminución de la electroactividad entre el primer y el décimo ciclo, tal y como se había concluido en la anterior etapa.

El LEA obtenido para el PGA-PEDOT-PEDOT-OH es 75,58% mientras que el obtenido para el PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH es de 77,43%, valores mayores que los obtenidos en la etapa anterior.

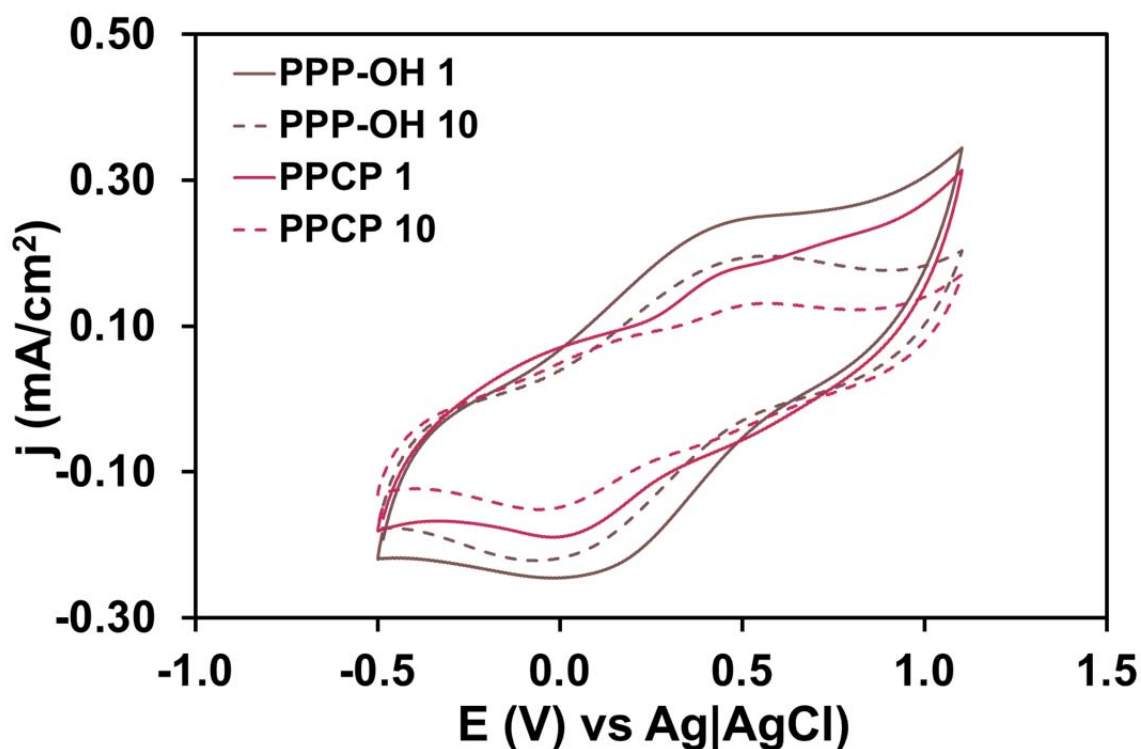


Fig. 187 Resultados de CV

### 4.2.3. EIS

Los ensayos de EIS se realizaron considerando las siguientes muestras: ITO (control), PGA, PGA-PEDOT, PGA-PEDOT/CUR, PGA-PEDOT-PEDOT-OH y PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH). Para ello se aplicó una pequeña perturbación de voltaje CA sinusoidal en torno su potencial de circuito abierto (OCP) en un rango de frecuencias (0.1-100 kHz) con una amplitud de 10 mV. Los resultados se representaron en forma de Nyquist y Bode Plot (Figura 28), y los datos se ajustaron con un modelo de circuito equivalente (Figura 27).

El circuito está compuesto por elementos de fase constante o capacitivos (CPE, que reemplaza la capacitancia ideal), la resistencia de la solución ( $R_s$ ) y la resistencia de transferencia de carga ( $R_c$ ). La CPE representa el paso de reacción cuando los electrones / iones se acumulan en una superficie, mientras que  $R_c$  indica el transporte de carga a través de materiales o interfaces.

La magnitud de la impedancia se ve afectada por el valor de frecuencia representado por los diagramas de Bode (Figura 28) con el logaritmo de la impedancia absoluta trazada contra el rango de frecuencias expresadas también en logaritmo. Todas las muestras presentaron valores de alta impedancia a altas frecuencias (1 kHz) debido a corrientes capacitivas, sin embargo, a bajas frecuencias fisiológicamente relevantes, la impedancia de los diferentes hidrogeles es significativamente menor que la de ITO. La resistencia ( $R_c$ ) de PGA puro, PGA-PEDOT y PGA-PEDOT-CUR es menor que los hidrogeles con el recubrimiento PEDOT-OH adicional, mientras que las capacidades son más altas, lo que indica que la interfaz de hidrogeles recubiertos conductores está representada principalmente por el elemento capacitivo en el circuito de Randles.

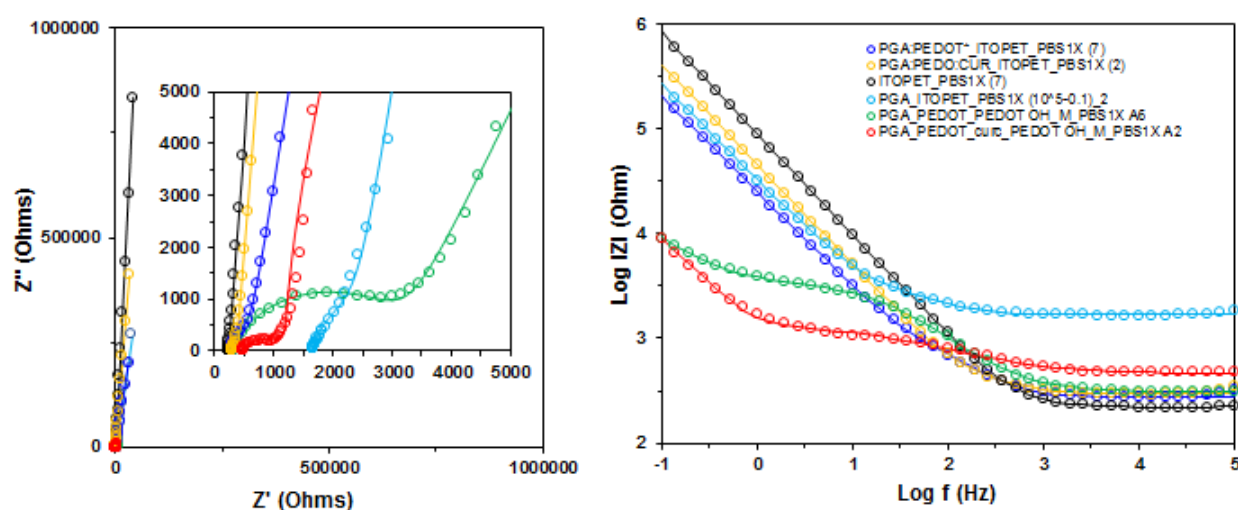


Fig. 28 Diagramas Nyquist y Bode EIS obtenidas mediante EIS



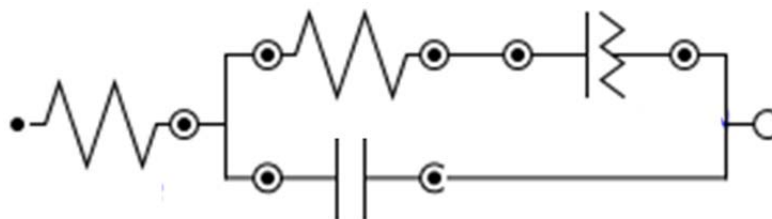


Fig. 29 Circuito equivalente emoleado para ajustar los diagramas representados en la figura 28

#### 4.2.4. LIBERACIÓN DE CURCUMINA

En este último apartado se comparan los siguientes hidrogeles: PGA-CUR y PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH, con el fin de examinar la liberación de curcumina mediante electroestimulación.

Para ello se sintetizaron 9 muestras de cada tipo de hidrogel, cada uno de los cuales con la misma concentración de curcumina.

Para realizar el estudio de la liberación de curcumina con el tiempo se consideraron los siguientes casos:

- 1) A 3 muestras de cada hidrogel no se les aplicó ningún tipo estímulo.
- 2) A 3 muestras de PGA-CUR y 3 de PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH se les aplicó una única vez una cronoamperometría durante 15 minutos con un voltaje de -0.5 V.
- 3) A las 3 muestras restantes de cada tipo de hidrogel se les aplicó la cronoamperometría mencionada en 2) de forma repetitiva cada 24 horas.

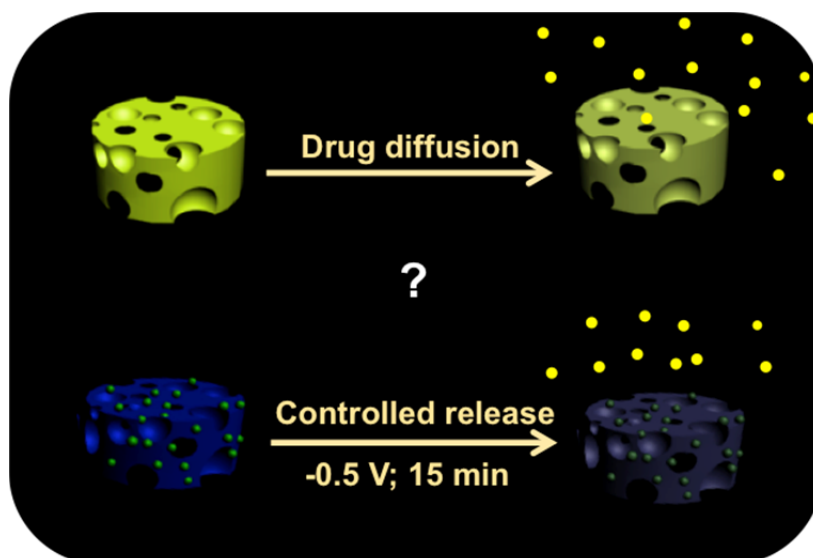


Fig. 30 Esquema del experimento

Los hidrogeles se sumergieron en 2 mL de una solución de PBS, estudiándose la liberación del fármaco mediante absorción. La metodología empleada era análoga a la descrita en el apartado 3.2.1. Tras cada ensayo de absorción, las muestras se rellenaron con PBS hasta alcanzar los 2 mL. Las muestras se conservaron en agitación a 80 rpm y a una temperatura de 37°C.

Pasados 3 días se cambió la disolución de PBS por una de PBS-TWEEN20 0.05% v/v ya que no se observó una liberación notable de curcumina. Para poder evaluar la influencia de este surfactante en la liberación se realizó una curva patrón de absorbancia en TWEEN20.

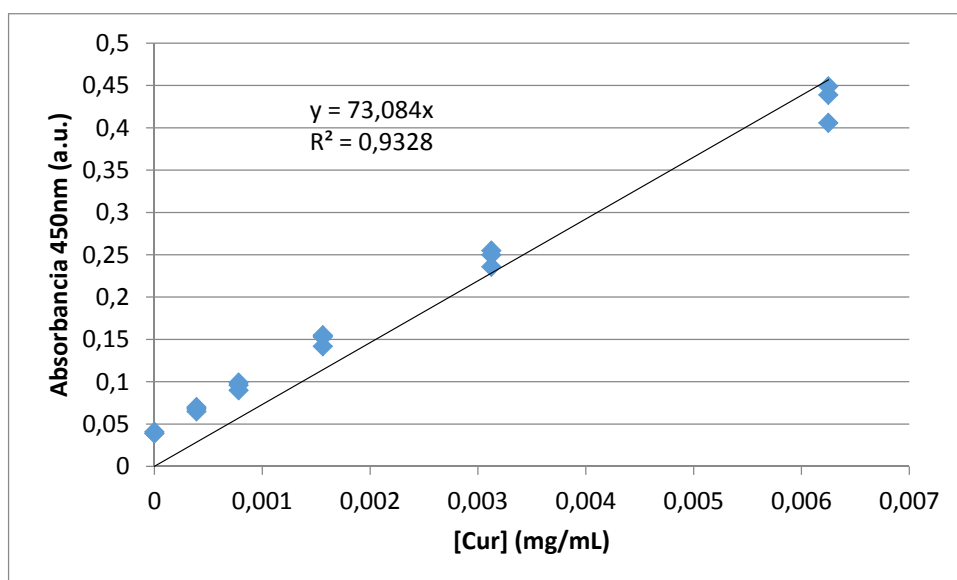


Fig. 31 Recta de calibrado en TWEEN20

Se debe decir que, con el paso de los días, algunas muestras se fueron desintegrando, por motivos desconocidos, por lo que se decidió finalizar el experimento antes de tiempo.

Respecto las muestras de PGA-CUR, se desintegraron las que previamente se les aplicó estímulo eléctrico y tan sólo se pudo hacer el estudio de liberación a las muestras de control.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

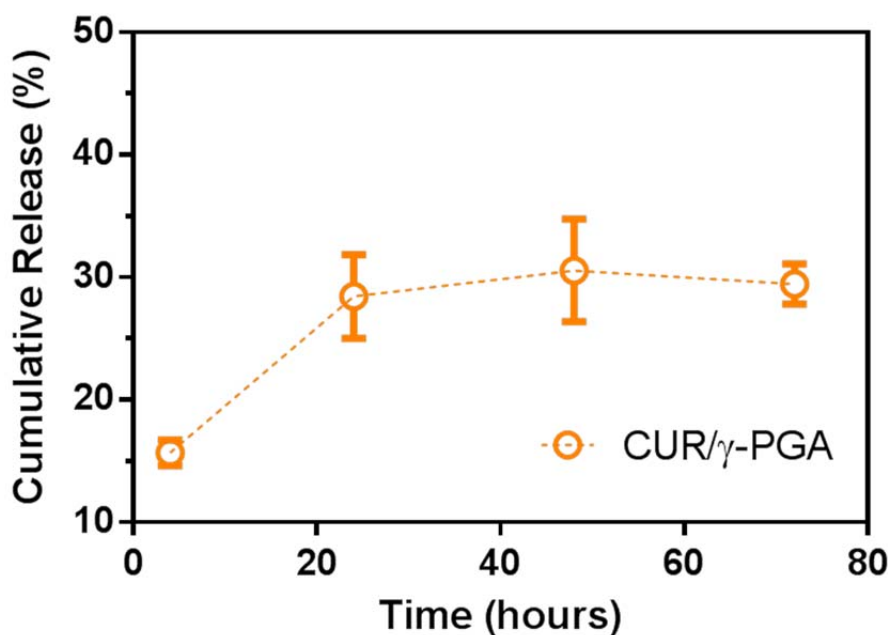


Fig. 32 Liberación acumulada de curcumina en PGA

La figura 32 muestra el perfil de liberación de la curcumina cuando se encuentra en el hidrogel. Se observa que la velocidad de liberación durante las primeras 20 horas es elevada y después de pasar las 24 h llega a un “plateau”. También se puede apreciar una notable dispersión en los resultados obtenidos entre las 20 y 72 horas, lo que indica que no todos los hidrogeles liberaron curcumina de igual manera. Estos resultados muestran que la cantidad de curcumina que se libera con el tiempo estudiado es un poco inferior al 30%.

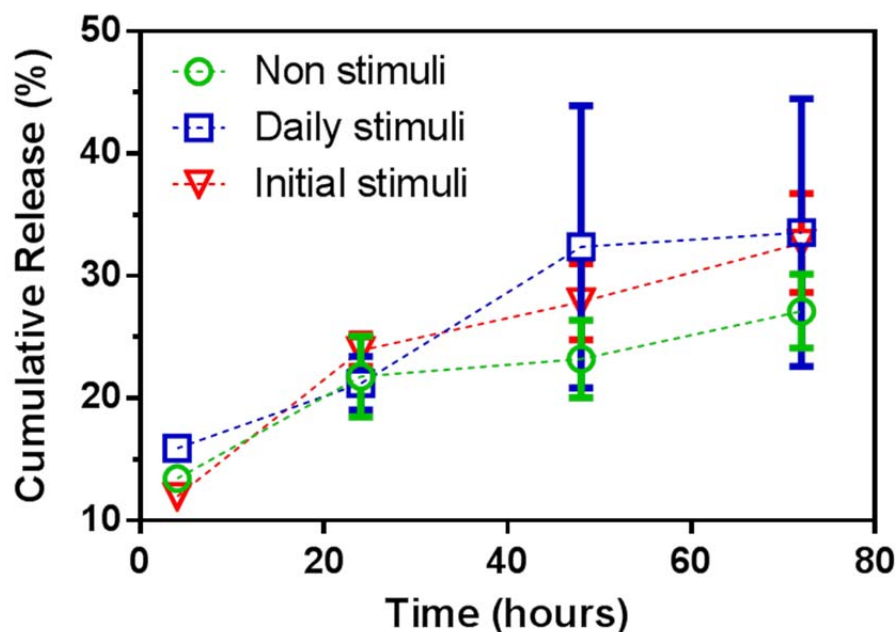


Fig. 193 Liberación acumulada de curcumina en PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH

Los resultados obtenidos para la liberación de curcumina en PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH se pueden observar en la figura 33. Se determinó que la liberación de curcumina es mayor si el hidrogel ha sido estimulado que si no lo ha sido. Si no ha sido estimulado, la liberación acumulada está en torno al 25% a las 72 horas mientras que si se estimula se llega a cifras cercanas al 35%. Durante las primeras 24 horas la velocidad de liberación es aproximadamente similar en las tres condiciones, pero a partir de dicho instante, el hidrogel sin estímulo libera a una velocidad inferior que las otras dos muestras.

Si comparamos la liberación de curcumina en las muestras sin estímulo, PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH y PGA-CUR, se observa que la liberación de curcumina en el hidrogel sin partículas de PEDOT es un 5% mayor que en el hidrogel con partículas de PEDOT. Esto puede ser debido a que la curcumina en el PGA-PEDOT/CUR-PEDOT-OH está más obstruida y se encuentra más atraída a las diferentes nanopartículas presentes en el hidrogel, resultando más complicada su liberación, mientras que cuando se encuentra en PGA-CUR tiene más libertad de movimiento y por lo tanto resulta más fácil su liberación.

## 5. Análisis de impacto ambiental

Se realizará un análisis del peligro que comportan algunas de las sustancias que se han utilizado durante la realización de este proyecto. Para ello, se seguirá la normativa de la Unión Europea vigente. Dicha normativa está sujeta a las normas REACH que engloba el marco reglamentario de gestión de las sustancias químicas.

El Reglamento (CE) nº 1907/2006 (en adelante denominado REACH, acrónimo de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas) entró en vigor el 1 de junio de 2007 y tiene como objetivo principal mejorar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas.

En principio el REACH es de aplicación para todas las sustancias químicas presentes en la vida diaria ya sea como tales, en forma de mezclas o contenidas en artículos, siendo, por tanto, de aplicación en sectores económicos de índole diversa.

Para cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la Unión Europea. Deben demostrar cómo usar dichas sustancias de manera segura y comunicar toda aquella información relativa a las medidas de gestión de riesgos a las partes implicadas.

De acuerdo con este reglamento actual se presentan en la Tabla 11111 las sustancias utilizadas que son clasificadas como peligrosas y sus pictogramas y en la tabla 11111 sus indicaciones (*Hazard Statements*) según el código establecido.

Tabla 3 Clasificación de las sustancias peligrosas utilizadas en el proyecto



Sustancia química	Tipo de peligro	Pictogramas
Acetona	H225, H319, H336, EUH066	
Etanol	H225	

Tabla 4 Significado de los *Hazard Statements* de las sustancias en la tabla 3

<i>Hazard Statement</i>	Significado
<b>H225</b>	Líquido inflamable
<b>H319</b>	Provoca grave irritación ocular
<b>H336</b>	Puede provocar vértigo o somnolencia
<b>EUOH66</b>	La exposición continuada puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel

Los residuos generados durante la realización de este proyecto se han depositado en contenedores especiales, dependiendo de si eran sustancias cloradas, no cloradas o residuos sólidos.

## Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer tras el desarrollo de este proyecto y del estudio de los resultados obtenidos son los siguientes:

- 1- Se ha conseguido sintetizar y caracterizar con éxito tanto las nanopartículas de PEDOT con y sin curcumina.
- 2- Se ha conseguido sintetizar y caracterizar con éxito los hidrogeles biodegradables obtenidos a partir de PGA. Además, dichos hidrogeles se han cargado con nanopartículas.
- 3- Se ha incrementado la electrosensibilidad de los hidrogeles cargados con nanopartículas mediante una nueva estrategia que consiste en la incorporación de más polímero conductor a partir de una electropolimerización in situ en hidrogeles cargados previamente. Aunque este es un proceso lento, los beneficios que aporta en cuanto a la capacidad para controlar la liberación justifican plenamente su uso.
- 4- Se ha determinado que la liberación controlada de curcumina está relacionada con el tipo de estímulo aplicado. No obstante, dicho estudio debería repetirse para aumentar la significancia estadística de los resultados.
- 5- El sistema diseñado resulta muy ventajoso como dispositivo capaz liberar el fármaco de forma controlada. Aunque el sistema presenta ciertas limitaciones, como la mencionada anteriormente, su optimización parece más que factible y probablemente se realizará en trabajos posteriores.





## Análisis Económico

En este apartado se hará un estudio sobre el coste aproximado que ha conllevado la realización de este proyecto.

### 1- Coste de productos químicos empleados.

Tabla 5 Coste de productos empleados

Producto	Precio	Cantidad	Coste(€)
APS	28,53€/kg	20g	0,57
Curcumina	4,85€/g	2g	9,7
EDOT	6,72€/g	1g	6,72
Etanol	20€/L	0,5L	10
PGA	3,16€/g	0,5g	1,58
EDC	15,55€/g	4	62,2
Cystamina	13,95€/g	2g	28
PBS	75,6€/kg	20g	1,51
DBSA	120€/g	0,2g	24
Hidroximetil EDOT	266€/g	200mg	53,2
Otros (+10%)			19,75
<b>Total productos</b>			<b>217,23</b>

## 2- Coste de los equipos empleados

Tabla 6 Coste de los equipos empleados

Equipo	Precio (€/h)	Tiempo(h)	Coste(€)
FTIR	22,5	2	45
UV-vis	37,5	2	75
Microscopio óptico	9	2	18
Lector Elisa	5	3	15
SEM	187,5	4	750
DLS	60	1	60
Raman	56,25	4	225
Electroestimulación	10	20	200
Otros	15	5	75
<b>Total equipos</b>			<b>1463</b>

## 3- Coste de personal

Tabla 7 Coste de personal

Función	Precio (€/h)	Tiempo (h)	Coste(€)
Estudio previo y documentación	10	50	500
Experimentación	15	360	5400
Análisis de resultados	20	120	2400
<b>Total personal</b>			<b>8300</b>

## 4- Coste total

Tabla 8 Coste total del proyecto

Concepto	Total (€)
Coste productos	217,23
Coste equipos	1463
Coste personal	8300
Subtotal	9980,23
Gastos generales (10% subtotal)	998
Coste operacional (21% subtotal)	2095,85
Total	13073,85

## Bibliografia

- [1] Daniel C. Harris, 2010. *"Quantitative chemical analysis"*. Library of Congress Control Number: 2009943186, ISBN-13: 978-1-4292-1815-3, ISBN-10: 1-4292-1815-0
- [2] [https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Cyclic\\_Voltammetry](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Cyclic_Voltammetry)
- [3] Autolab Application Note EC08. Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT) – Electrochemical cell setup. A: *Metrohm Autolab B.V.* 2011, p. 1-3
- [4] [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1983-41952015000400529](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-41952015000400529)
- [5] [https://www.espectrometria.com/espectrometria\\_raman](https://www.espectrometria.com/espectrometria_raman)
- [6] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/522953?lang=es&region=ES>
- [7] Anna Puiggali-Jou, Paolo Micheletti, Francesc Estrany, Luis J. del Valle, and C.A. i An. Electrostimulated Release of Neutral Drugs from Polythiophene Nanoparticles: Smart Regulation of Drug–Polymer Interactions. A: . 2016, p. 432833.
- [8] Mohan, P.R.K. et al. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. A: *Vibrational Spectroscopy* [en línia]. Elsevier B.V., 2012, Vol. 62, p. 77-84. ISSN 09242031. DOI 10.1016/j.vibspec.2012.05.002. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.05.002>.
- [9] Huang, W.C. et al. Conductive nanogel-interfaced neural microelectrode arrays with electrically controlled in-situ delivery of manganese ions enabling high-resolution MEMRI for synchronous neural tracing with deep brain stimulation. A: *Biomaterials* [en línia]. Elsevier Ltd, 2017, Vol. 122, núm. 1001, p. 141-153. ISSN 18785905. DOI 10.1016/j.biomaterials.2017.01.013. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.013>.
- [10] M. M. Pérez-Madrigal, M. G. Edo, A. Díaz, J. Puiggalí, C. Alemán, J. Phys. Chem. C 2017, 121, 3182.

## Bibliografía complementaria

[11] [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/702811?lang=es&region=ES&gclid=CjwKCAiAm7LSBRBBEiwAvL1-Lwj5-7WNiefqCatp6q82JcYeexwl4sF4hhfZe64LmC2WuR1EuG9bKBoCkEEQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/702811?lang=es&region=ES&gclid=CjwKCAiAm7LSBRBBEiwAvL1-Lwj5-7WNiefqCatp6q82JcYeexwl4sF4hhfZe64LmC2WuR1EuG9bKBoCkEEQAvD_BwE)

[12] Boehler, C. et al. Actively controlled release of Dexamethasone from neural microelectrodes in a chronic in vivo study. A: *Biomaterials* [en línia]. Elsevier Ltd, 2017, Vol. 129, p. 176-187. ISSN 18785905. DOI 10.1016/j.biomaterials.2017.03.019. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.019>.

[13] Uppalapati, D. et al. Conducting polymers with defined micro- or nanostructures for drug delivery. A: *Biomaterials* [en línia]. Elsevier Ltd, 2016, Vol. 111, p. 149-162. ISSN 18785905. DOI 10.1016/j.biomaterials.2016.09.021. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.021>.

[14] Abidian, M.R., Kim, D.H. i Martin, D.C. Conducting-polymer nanotubes for controlled drug release. A: *Advanced Materials*. 2006, Vol. 18, núm. 4, p. 405-409. ISSN 09359648. DOI 10.1002/adma.200501726.

[15] Hosseini-Nassab, N. et al. Electrically controlled release of insulin using polypyrrole nanoparticles. A: *Nanoscale* [en línia]. Royal Society of Chemistry, 2017, Vol. 9, núm. 1, p. 143-149. ISSN 2040-3364. DOI 10.1039/C6NR08288B. Disponible a: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6NR08288B>.

[16] Boehler, C. et al. Actively controlled release of Dexamethasone from neural microelectrodes in a chronic in vivo study. A: *Biomaterials* [en línia]. Elsevier Ltd, 2017, Vol. 129, p. 176-187. ISSN 18785905. DOI 10.1016/j.biomaterials.2017.03.019. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.019>